

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-502344

(P2005-502344A)

(43) 公表日 平成17年1月27日(2005.1.27)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 14/705	C O 7 K 14/705	4 B O 2 4
C O 7 K 16/28	C O 7 K 16/28	4 B O 6 3
C O 7 K 19/00	C O 7 K 19/00	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 174 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-523647 (P2003-523647)	(71) 出願人	597011463 ノバルティス アクチエンゲゼルシャフト スイス国、4056 バーゼル、リヒトシ ュトラーセ 35
(86) (22) 出願日	平成14年8月26日 (2002.8.26)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(85) 翻訳文提出日	平成16年2月25日 (2004.2.25)	(74) 代理人	100067035 弁理士 岩崎 光隆
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/009518	(74) 代理人	100064610 弁理士 中嶋 正二
(87) 国際公開番号	W02003/018798	(74) 代理人	100072730 弁理士 小島 一晃
(87) 国際公開日	平成15年3月6日 (2003.3.6)	(72) 発明者	クレメンス・カウプマン スイス4057バーゼル、ハンマーシュト ラーセ135番
(31) 優先権主張番号	60/315,111		
(32) 優先日	平成13年8月27日 (2001.8.27)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】新規Gタンパク質共役受容体およびそのDNA配列

(57) 【要約】

この発明は、新たに同定されたポリペプチドおよび上記ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド、診断および治療上有用な可能性のあるアゴニスト、アンタゴニストであり得る化合物の同定におけるそれらの使用、およびGタンパク質共役受容体のクラスに属する、上記ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの製法に関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) 配列番号 3 または配列番号 5 の配列を含むポリヌクレオチドによりコード化される単離 m G R R ポリペプチド、
- (b) 配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチド配列と少なくとも 96% の同一性を有するポリペプチド配列を含み、リガンド結合検定法において m G R R の場合と類似した特性を示す単離 m G R R ポリペプチド、
- (c) 配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチド配列を含む単離 m G R R 1 b または m G R R 2 ポリペプチド、
- (d) 配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチド配列と少なくとも 96% の同一性を有し、リガンド結合検定法において m G R R の場合と類似した特性を示す単離 m G R R ポリペプチド、
- (e) 配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチド配列、
- (f) 配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチド配列と比べて 0.96 の同一性指数を有するポリペプチド配列を有するかまたは含む単離 m G R R ポリペプチド、
- (g) (a) ~ (f) 記載の上記ポリペプチドのフラグメントまたは変異型から成る群の一つから選択される単離 m G R R ポリペプチド。

10

【請求項 2】

配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチド配列である、請求項 1 記載の単離ポリペプチド。

20

【請求項 3】

- (a) 配列番号 3 または配列番号 5 のポリヌクレオチド配列と少なくとも 80% の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含み、リガンド結合検定法において m G R R と類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離 m G R R ポリヌクレオチド、
- (b) 配列番号 3 または配列番号 5 のポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド、
- (c) 配列番号 3 または配列番号 5 のポリヌクレオチドと少なくとも 96% の同一性を含み、リガンド結合検定法において m G R R と類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、
- (d) 配列番号 3 または配列番号 5 の単離ポリヌクレオチド、
- (e) 配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチド配列と少なくとも 96% の同一性を有するポリペプチド配列をコード化するポリヌクレオチド配列を含み、リガンド結合検定法において m G R R と類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、
- (f) 配列番号 3 または配列番号 5 のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、
- (g) 配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチド配列と少なくとも 96% の同一性を有するポリペプチド配列をコード化するポリヌクレオチド配列を含み、リガンド結合検定法において m G R R と類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、
- (h) 配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、
- (i) 配列番号 3 または配列番号 5 のポリヌクレオチド配列に対し 0.96 の同一性指数を有するポリヌクレオチド配列を含み、リガンド結合検定法において m G R R と類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、または
- (k) 配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチド配列に対し 0.96 の同一性指数を有するポリペプチド配列をコード化するポリヌクレオチド配列を含み、リガンド結合検定法において m G R R と類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、または上述のポリヌクレオチドのフラグメントまたは変異型であるかまたはその全長にわたって上述のポリヌクレオチドと相補的であるポリヌクレオチドから成る群の一つから選択される単離 m G R R ポリヌクレオチド。

30

40

【請求項 4】

50

- (a) 配列番号 3 または配列番号 5 のポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド、
- (b) 配列番号 3 または配列番号 5 の単離ポリヌクレオチド
- (c) 配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、および
- (d) 配列番号 4 または配列番号 6 のポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチドから成る群から選択される、請求項 3 記載の単離ポリヌクレオチド。

【請求項 5】

発現ベクターが適合し得る宿主細胞に存在するとき、請求項 1 記載のポリペプチドを生産し得るポリヌクレオチドを含む発現系。

【請求項 6】

請求項 5 記載の発現ベクターを含む組換え宿主細胞または請求項 1 記載のポリペプチドを発現するその膜。

【請求項 7】

ポリペプチドの生産に十分な条件下で請求項 6 記載の宿主細胞を培養し、培養培地からポリペプチドを採取する工程を含む、請求項 1 記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 8】

免疫グロブリン Fc 領域および請求項 1 のいずれか一つのポリペプチドから成る融合タンパク質。

【請求項 9】

請求項 1 ~2 のいずれか 1 項記載のポリペプチドについて免疫特異性を示す抗体。

【請求項 10】

請求項 1 記載のポリペプチドの機能またはレベルを刺激または阻害する化合物を同定するためのスクリーニング方法であって、

- (a) 候補化合物に直接的または間接的に随伴した標識手段によりポリペプチドへの(またはポリペプチドを発現する細胞または膜への)またはその融合タンパク質への候補化合物の結合を定量的または定性的に測定または検出する、
- (b) 標識競合体の存在下において、ポリペプチドへの(またはポリペプチドを発現する細胞または膜への)またはその融合タンパク質への候補化合物の結合の競合を測定する、
- (c) ポリペプチドを発現する細胞または細胞膜に適切な検出系を用いて、候補化合物がポリペプチドの活性化または阻害によりシグナルを発生させるか否かを試験する、
- (d) 請求項 1 記載のポリペプチドを含む溶液と候補化合物を混合して混合物を形成させ、混合物におけるポリペプチドの活性を測定し、そして候補化合物を含まない対照混合物と上記混合物の活性を比較するか、または
- (e) 例えば ELISA 検定法を用いて、細胞における上記ポリペプチドをコード化する mRNA または上記ポリペプチドの生産に対する候補化合物の影響を検出し、そして
- (f) バイオテクノロジー的または化学的標準技術にしたがって上記化合物を生産させる工程から成る群から選択される方法を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

この発明は、新たに同定されたポリペプチドおよび上記ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド、診断、および治療において潜在的に有用なアゴニストまたはアンタゴニストであり得る化合物の同定におけるそれらの使用、および G タンパク質共役受容体 (GPCR) との類似性を共有する上記ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの生産に関するものである。

【0002】

発明の背景

創薬過程は、近年、それが「ファンクショナル・ゲノミクス(機能ゲノム解析)」、すなわち高スループットのゲノムまたは遺伝子に基いた生物学を取り入れていることから、根本的な変革を被っている。治療標的として遺伝子および遺伝子産物を同定する手段としての

10

20

30

40

50

この方法は、急速に「ポジショナル・クローニング」に基いた初期の方法に取って代わっている。表現型、すなわち生物学的機能または遺伝病を同定し、次いで、その遺伝地図の位置に基いて、関与する遺伝子を突きとめる。ファンクショナル・ゲノミクスは、高スループットDNA配列決定技術および現時点で利用可能な多くの分子生物学データベースから潜在的興味の対象である遺伝子配列を同定するためのバイオインフォマティクスの様々なツールに大いなる信頼をおくものである。創薬標的としてのさらなる遺伝子およびそれらの関連ポリペプチド/タンパク質の同定および特性確認が依然として要望されている。

【0003】

発明の要旨

本発明は、本明細書でヒトmGRR1a、mGRR1bおよびmGRR2(本明細書では3つともmGRRとして称す)として称しているヒト起源の精製代謝型グルタミン酸受容体関連膜受容体タンパク質に関するものである。代謝型グルタミン酸受容体とmGRRの類似性は、これらの受容体と同じくGPCRのファミリー3に属することを示唆している。この受容体ファミリーは、代謝型グルタミン酸受容体、GABA-B受容体、Ca-知覚受容体、推定味覚受容体および嗅覚鋤骨鼻受容体のファミリーを包含する。公開ドメインデータベースにおいて本発明ポリペプチドと最も近いことが見出された哺乳類GPCR相同体は、配列番号2に記載されたmGRR1aのポリペプチドと23%同一で43%類似したアミノ酸残基を有する代謝型グルタミン酸受容体3型(受託番号Q11923)である。上記ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、限定されるわけではないが、中枢および末梢神経系に伴う疾患の処置を含むある種の疾患の処置方法に関して興味の対象となっている。特に、mGRR受容体アゴニストまたはアンタゴニストは、例えば、限定されるわけではないが、痴呆症、精神分裂病、うつ病、情動障害、癲癇および運動障害を含む神経学的および/または精神医学的疾患の処置に有用であり得、これらを以後「本発明の疾患」と称する。さらに別の態様において、本発明は、本発明で提供される材料を用いてmGRRに対するアゴニストおよびアンタゴニスト(例、阻害剤)を同定し、上記化合物の不均衡に伴う状態を処置する方法に関するものである。さらに別の態様において、本発明は、不適切なmGRR活性またはレベルに伴う疾患を検出するための診断的検定法に関するものである。

10

20

【0004】

発明の記載

(用語解説)

本明細書で使用されているある種の用語を理解し易くするため以下の定義を与える。

【0005】

「単離(された)」は、その天然の状態から改変されていること、すなわちそれが天然で存する場合、そのもとの環境からそれを変化させたかまたは取り除いたこと、またはその両方を意味する。例えば、この語が本明細書で使用されているところによると、生きている生物体に天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは「単離されて」おらず、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドでも、その天然状態の共存物質から分離されると、「単離された」ことになる。さらに、形質転換、遺伝子操作または他のあらゆる組換え方法により生物体へ導入されたポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、それが依然として上記生物体に存在している場合でも「単離され」ており、その生物体は生きている場合も死んでいる場合もあり得る。

30

40

【0006】

「ポリヌクレオチド」は、一般的にポリリボヌクレオチド(RNA)またはポリデオキシリボヌクレオチド(DNA)を包含し、それらは非修飾または修飾RNAまたはDNAであり得る。「ポリヌクレオチド」は、1本および2本鎖DNA、1本および2本鎖領域の混合物であるDNA、1本および2本鎖RNA、および1本および2本鎖領域の混合物であるDNA、1本鎖またはより典型的には2本鎖または1本および2本鎖領域の混合物であり得るDNAおよびRNAを含むハイブリッド分子を包含するが、限定はされない。さらに、「ポリヌクレオチド」は、RNAまたはDNAまたはRNAおよびDNAの両方を含む

50

3本鎖領域をいう。「ポリヌクレオチド」の語はまた、1個またはそれ以上の修飾塩基を含むDNAまたはRNA並びに安定性または他の理由により修飾されたバックボーンをもつDNAまたはRNAを包含する。

【0007】

「修飾(された)」塩基は、例えばトリチル化塩基および特異塩基、例えばイノシンを包含する。様々な修飾がDNAおよびRNAに加えられ得る、すなわち、「ポリヌクレオチド」は、典型的には天然で見出されるポリヌクレオチドの化学的、酵素的または代謝的修飾形態、並びにウイルスおよび細胞に特有なDNAおよびRNAの化学的形態を包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、オリゴヌクレオチドと称されることが多い、比較的短いポリヌクレオチドも包含する。

10

【0008】

「ポリペプチド」は、ペプチド結合または修飾ペプチド結合、すなわちペプチドアイソスターにより互いに連結された2個またはそれ以上のアミノ酸を含むポリペプチドをいう。「ポリペプチド」は、通常ペプチド、オリゴペプチドまたはオリゴマーと称される短い鎖、および一般的にタンパク質と称される長い鎖の両方をいう。ポリペプチドは、20遺伝子コード化アミノ酸以外のアミノ酸を含み得る。「ポリペプチド」は、天然プロセス、例えば翻訳後プロセッシングにより、または当業界で公知の化学的修飾技術により修飾されたアミノ酸配列を含む。上記修飾は基本的テキストおよびより詳細なモノグラフ並びに当業者に馴染みのある多量の研究文献に詳述されている。修飾は、ペプチドバックボーン、アミノ酸側鎖およびアミノまたはカルボキシ末端を含むポリペプチドのいずれの場所でも加えられ得る。同じタイプの修飾が所定のポリペプチドにおける幾つかの部位で同程度または様々な程度で存在し得るものとする。また、所定のポリペプチドは、多くのタイプの修飾を含み得る。ポリペプチドはユビキチン化の結果として分枝状であり得、それらは環状であり、分枝状形態を伴う場合も伴わない場合もあり得る。環状、分枝状および分枝状環状ポリペプチドは、翻訳後天然プロセスから生じ得るかまたは合成方法により生成され得る。修飾には、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、ピオチニル化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、閉環、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有交差結合の形成、システインの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマ-カルボキシル化、グリコシル化、GP 30
Iアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解プロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、タンパク質へのアミノ酸の転移RNA伝達付加、例えばアルギニル化およびユビキチン化がある(例えば、Proteins Structure and Molecular Properties、第2版、T.E.Creighton、W.H.Freeman アンド・カンパニー、ニューヨーク、1993、Wold,F., Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects、1-12、Post-translational Covalent Modification of Proteins、B.C.Johnson編、アカデミック・プレス、ニューヨーク、1983、Seifter et al、"Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors"、Meth Enzymol、182、626-646、1990およびRattan et al、"Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging"、Ann 40
NY Acad Sci、663、48-62、1992参照)。

【0009】

ポリペプチド配列の「フラグメント」は、対照基準配列よりも短い、対照基準ポリペプチドと本質的に同じ生物学的機能または活性を保持しているポリペプチド配列をいう。ポリヌクレオチド配列の「フラグメント」は、配列番号1、配列番号3または配列番号4の対照基準配列よりも短いポリヌクレオチド配列をいう。

【0010】

「mGRR」は、2種のスプライス変異型ヒトmGRR1aおよびmGRR1bおよびヒトmGRR2をいう。mGRR1bのN-末端配列(アミノ酸1~53)は、mGRR1aのN-末端配列(アミノ酸1~82)と著しい配列類似性は共有していない。ヒトmGRR 50

2 アミノ酸配列は、ヒト m G R R 1 a と 5 9 % 同一性を有する (m G R R 1 a の 8 1 ~ 7 6 5 との m G R R 2 の最適アラインメント残基 6 1 - 7 3 3)。

【 0 0 1 1 】

「変異型」は、対照基準ポリヌクレオチドまたはポリペプチドとは異なるが、その本質的特性を保持しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。ポリヌクレオチドの典型的変異型は、対照基準ポリヌクレオチドとはヌクレオチド配列が異なる。変異型のヌクレオチド配列における変化は、対照基準ポリヌクレオチドによりコード化されるポリペプチドのアミノ酸配列を改変する場合もしない場合もあり得る。ヌクレオチド変化の結果、下記で検討しているように、対照基準配列によりコード化されるポリペプチドにおいてアミノ酸置換、付加、欠失、融合および先端切除が誘導され得る。ポリペプチドの典型的変異型は、対照基準ポリペプチドとはアミノ酸配列が異なる。一般的に、改変は、対照基準ポリペプチドおよび変異型の配列が全体的には密接に類似しており、多くの領域が一致しているように制限される。変異型および対照基準ポリペプチドは、1個またはそれ以上の置換、挿入、欠失を組合わせたことによりアミノ酸配列が異なり得る。置換または挿入されたアミノ酸残基は、遺伝コードによりコード化されるものである場合もそうではない場合もあり得る。典型的同類置換には、G l y、A l a ; V a l、I l e、L e u ; A s p、G l u ; A s n、G l n - I S e r、T h r ; L y s、A r g、および P h e および T y r がある。ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの変異型は、天然に存する例えば対立遺伝子であり得るか、または天然に存することが知られていない変異型であり得る。ポリヌクレオチドおよびポリペプチドの非天然変異型は、突然変異導入技術または直接合成により生成され得る。また、1個またはそれ以上の翻訳後修飾、例えばグリコシル化、リン酸化、メチル化、A D I P リボシル化などを有するポリペプチドも変異型として包含される。例としては、N - 末端アミノ酸のメチル化、セリンおよびトレオニンのリン酸化および C - 末端グリシンの修飾がある。

10

20

【 0 0 1 2 】

「多型」は、集団内のゲノムでの所定の位置におけるヌクレオチド配列 (および関連性がある場合、コード化されたポリペプチド配列) の変形をいう。

【 0 0 1 3 】

「一塩基多型」(S N P) は、集団内での、ゲノムにおける単一ヌクレオチド位置でのヌクレオチド変異性の出現をいう。S N P は、遺伝子内またはゲノムの遺伝子間領域内で出現し得る。S N P は、対立遺伝子特異的増幅法 (A S A) を用いて検定され得る。このプロセスについては、少なくとも 3 プライマーが要求される。共通プライマーは、検定されている多型に対し逆相補型で使用される。この共通プライマーは、多型塩基からの 5 0 と 1 5 0 0 b p s の間であり得る。最終 3' 塩基の揺らぎにより多型を構成する 2 (またはそれ以上) の対立遺伝子の 1 つと対合すること以外、他の 2 つ (またはそれ以上) のプライマーは互いに同一である。次いで、2 つ (またはそれ以上) の P C R 反応を、試料 D N A において、各々共通プライマーおよび対立遺伝子特異的プライマーの 1 つを用いて実施する。

30

【 0 0 1 4 】

本明細書で使用されている「スプライス変異型」は、同じゲノム D N A 配列から最初に転写された R N A 分子から生成されてはいるが、オルターナティブ (選択的) R N A スプライシングが行なわれた c D N A 分子をいう。オルターナティブ R N A スプライシングが行なわれるのは、一次 R N A 転写物に対してスプライシングが行なわれ、その過程で一般的にイントロンが除去され、その結果、各々異なるアミノ酸配列をコード化し得る複数の m R N A 分子がつけられる場合である。スプライス変異型の語はまた、上記 c D N A 分子によりコード化されたタンパク質をいう。

40

【 0 0 1 5 】

「同一性」は、配列比較により決定された、2 つまたはそれ以上のポリペプチド配列または 2 つまたはそれ以上のポリヌクレオチド配列間における関係を反映する。一般に、同一性は、それぞれ比較されている配列の長さ全体におよぶ、2 つのポリヌクレオチドまたは 2 つのポリペプチド配列の正確なヌクレオチド対ヌクレオチドまたはアミノ酸対アミノ酸

50

の一致をいう。

【0016】

「同一性%」 - 正確な一致が存在しない配列については、「同一性%」が測定され得る。一般に、比較される2配列を平行整列させると配列間の最大相関関係が得られる。これは、一または両配列における「ギャップ」挿入を含むことにより、アラインメントの程度を高め得る。同一性%は、同一または非常に類似した長さの配列に特に適切である、比較されている配列の各々の全長にわたって(いわゆるグローバルアラインメント)決定され得るか、または長さが等しくない配列により適切である、短い特定された長さにわたって(いわゆるローカルアラインメント)決定され得る。

【0017】

「類似性」は、2ポリペプチド配列間における関係のさらなる精巧な尺度である。一般的に、「類似性」は、比較(同一性について)されている各配列からの一つで、間にある残基対における正確な一致だけでなく、正確な一致が存在しない場合は、進化に基いて、一残基が他の残基の代用になる見込みがあるか否かを考慮しながら、一つ一つの残基を基にした2ポリペプチド鎖のアミノ酸間の比較を意味する。この見込みは関連「スコア」を有し、それから2配列の「類似性%」が測定され得る。

【0018】

2またはそれ以上の配列の同一性および類似性の比較方法は、当業界では公知である。すなわち例えば、ウィスコンシン配列解析パッケージバージョン9.1 (Devereux J et al, Nucleic Acids Res, 12, 387 - 395, 1984, 米国ウィスコンシン、マディソンのジェネティクス・コンピューター・グループから入手可能)で利用可能なプログラム、例えばBESTFITおよびGAPプログラムを用いることにより、2ポリヌクレオチド間の同一性%および2ポリペプチド配列間の同一性%および類似性%が測定され得る。BESTFITは、SmithおよびWaterman(J Mol Biol, 147, 195 - 197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482 - 489, 1981)の「局所ホモロジー」アルゴリズムを用い、2配列間における類似性の最適単一領域を見出す。BESTFITは、長さが異なる2ポリヌクレオチドまたは2ポリペプチド配列の比較により適しており、このプログラムは短い方の配列が長い方の一部分を示すことを想定している。これに比べて、GAPは2配列を整列させ、NeedlemanおよびWunschのアルゴリズム(J Mol Biol, 48, 443 - 453, 1970)にしたがって「最大類似性」を見出す。GAPは、長さがほぼ同じである配列の比較により適しており、アラインメントは全長におよぶと予測される。好ましくは、各プログラムで使用されているパラメーター「ギャップ・ウェイト」および「レンジス・ウェイト」は、それぞれポリヌクレオチド配列については50および3、ポリペプチド配列については12および4である。好ましくは、比較されている2配列が最適な形で整列されているときに同一性および類似性%を測定する。

【0019】

配列間における同一性および/または類似性測定についての他のプログラムもまた当業界では公知であり、例えば、BLASTファミリーのプログラム(Altschul S F et al, J Mol Biol, 215, 403 - 410, 1990, Altschul S F et al, Nucleic Acids Res, 25: 389 - 3402, 1997, 米国メリーランド、ベセズダのナショナル・センター・フォー・バイオテクノロジー・インフォメーション(NCBI)から利用可能であり、NCBIのホームページ、www.ncbi.nlm.nih.govによりアクセスできる)およびFASTA (Pearson W R, Methods in Enzymology, 183, 63 - 99, 1990, Pearson W RおよびLipman D J, Proc Nat Acad Sci USA, 85, 2444 - 2448, 1988, ウィスコンシン・シーケンス・アナリシス・パッケージの一部として利用可能)がある。

【0020】

好ましくは、BLOSUM62アミノ酸置換マトリックス(Henikoff SおよびHenikoff J G, Proc.Nat.Acad.Sci.USA, 89, 10915 - 10919, 1992)は、ヌクレオチド配列が比較前に最初にアミノ酸配列に翻訳されている場合を含むポリペプチド配列比較

10

20

30

40

50

で使用される。

【0021】

好ましくは、プログラムBESTFITを用いて、対照基準ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に関する問題のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の同一性を測定し、その場合上記の通り、問題配列および対照基準配列を最適な形で整列させ、プログラムのパラメーターをデフォルト値で設定する。

【0022】

「同一性指数」は、候補配列(ポリヌクレオチドまたはポリペプチド)および対照基準配列の比較に使用され得る配列関連性の尺度である。すなわち、例えば、対照基準ポリヌクレオチド配列に対し例えば0.95の同一性指数を有する候補ポリヌクレオチド配列は、候補ポリヌクレオチド配列が対照基準配列の各100ヌクレオチドにつき平均して5個以下の差異を含み得る点以外、対照基準配列と同一である。上記差異は、少なくとも1つのヌクレオチド欠失、トランジションおよびトランスバージョンを含む置換、または挿入から成る群から選択される。これらの差異は、対照基準ポリヌクレオチド配列の5'または3'末端位置またはこれらの末端位置間におけるいずれかの場所に存し得、対照基準配列におけるヌクレオチド間で個々に、または対照基準配列内で1つまたはそれ以上の連続群として点在している。言い換えれば、対照基準ポリヌクレオチド配列に対し0.95の同一性指数を有するポリヌクレオチド配列を得るためには、上記の通り、対照基準配列における100ヌクレオチドごとに平均5~25個以下の割合で欠失、置換または挿入、またはそれらの組み合わせが導入され得る。同じことが、必要な変更を加えて、同一性指数の他の値、例えば0.96、0.97、0.98および0.99についても適用される。

10

20

【0023】

同様に、ポリペプチドの場合、例えば、対照基準ポリペプチド配列に対し0.95の同一性指数を有する候補ポリペプチド配列は、ポリペプチド配列が対照基準配列の各100アミノ酸につき平均して5個以下の差異を含み得る点以外、対照基準配列と同一である。上記差異は、少なくとも1つのアミノ酸欠失、同類および非同類置換を含む置換、または挿入から成る群から選択される。これらの差異は、対照基準ポリペプチド配列のアミノ-またはカルボキシ-末端位置またはこれらの末端位置間におけるいずれかの場所に存し得、対照基準配列におけるアミノ酸間で個々に、または対照基準配列内で1つまたはそれ以上の連続群として点在している。言い換えれば、対照基準ポリペプチド配列に対し0.95の同一性指数を有するポリペプチド配列を得るためには、上記の通り、対照基準配列における100アミノ酸ごとに平均5以下の割合で欠失、置換または挿入、またはそれらの組み合わせが導入され得る。同じことが、必要な変更を加えて、同一性指数の他の値、例えば0.96、0.97、0.98および0.99についても適用される。ヌクレオチドまたはアミノ酸差異の数および同一性指数間の関係は、以下の等式で表され得る：

30

$$n_a = x_a - (x_a \cdot I)$$

[式中、

n_a は、ヌクレオチドまたはアミノ酸差異の数であり、

x_a は、それぞれmGRR1aについては配列番号1または配列番号2、mGRR1bについては配列番号4または配列番号5におけるヌクレオチドまたはアミノ酸の総数であり

40

Iは同一性指数であり、

・は、掛け算演算子についての記号であり、 x_a とIの積が整数ではないとき、 x_a から積を引く前に端数切り捨てにより最も近い整数にする]

【0024】

「相同体」は、当業界で使用される一般用語であり、対照基準配列との高度の配列関連性を有するポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を示す。上記関連性は、上記の2配列間における同一性および/または類似性の度合を測定することにより定量され得る。「オーソログ」は、別種におけるポリヌクレオチドまたはポリペプチドの機能的均等内容配列であるポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。「パラログ」は、同種内で機能的に

50

類似しているポリヌクレオチドまたはポリペプチドをいう。

【0025】

「融合タンパク質」は、2つの非関連融合遺伝子またはそのフラグメントによりコード化されるタンパク質をいう。例は米国特許第5541087、5726044号に開示されている。Fc-mGRRの場合、融合タンパク質の一部として免疫グロブリンFc領域を用いることが、Fc-mGRRまたはmGRRのフラグメントの機能的発現を遂行させるのに有利であり、それによって治療に使用するとき上記融合タンパク質の薬物動態特性が改善され、2量体Fc-mGRRが生成される。Fc-mGRR DNA構築物は、5'~3'方向で、分泌カセット、すなわち哺乳類細胞からの輸送を誘発するシグナル配列、融合相手として免疫グロブリンFc領域フラグメントをコード化するDNA、およびFc-mGRRまたはそのフラグメントをコード化するDNAを含み得る。使用する際、機能的Fc側鎖に突然変異を導入し、融合タンパク質の残りの部分は無傷のままにしておくかまたは完全に発現後Fc部分を欠失させることにより、内在的機能特性(補体結合性、Fc-受容体結合性)を改変できるのが望ましい場合もある。

10

【0026】

第一の態様において、本発明はmGRRポリペプチドを提供する。

上記ポリペプチドは、以下のものを含む：

(a)配列番号1、配列番号3または配列番号4の配列を含むポリヌクレオチドによりコード化される単離mGRRポリペプチド、

(b)配列番号2または配列番号5のポリペプチド配列と少なくとも80%、90%、95%、98%または99%同一性を有するポリペプチド配列を含み、リガンド結合検定法においてmGRRの場合と類似した特性を示す単離mGRRポリペプチド、

20

(c)配列番号2または配列番号5のポリペプチド配列を含む単離mGRR1aまたはmGRR1bポリペプチド、

(d)配列番号2または配列番号5のポリペプチド配列と少なくとも80%、90%、95%、98%または99%同一性を有し、リガンド結合検定法においてmGRRの場合と類似した特性を示す単離mGRRポリペプチド、

(e)配列番号2または配列番号5のポリペプチド配列、

(f)配列番号2または配列番号5のポリペプチド配列に対し0.80、0.90、0.95、0.98または0.99の同一性指数を有するポリペプチド配列を有するかまたは含み、リガンド結合検定法においてmGRRの場合と類似した特性を示す単離mGRRポリペプチド、または

30

(g)(a)~(f)による上記ポリペプチドのフラグメントまたは変異型。

【0027】

リガンド結合検定法における類似特性とは、緩衝液、イオン、pHおよび他の調節因子、例えばヌクレオチドについて同一条件下、検出可能シグナル対ノイズ比が、mGRRポリペプチドのシグナルの+/-30%の範囲であることを意味する。

【0028】

本発明ポリペプチドは、ポリペプチドのGタンパク質共役受容体ファミリーの構成員である。観察されたmGRR1 mRNAの脳特異領域分布(表1)は、mGRRリガンドについての指標に関する情報を提供する。mGRRリガンドは、天然リガンド並びにmGRR活性のモジュレーター、例えば抗mGRR抗体および/またはmGRR介在シグナル伝達を高めるかまたはそれに拮抗する小分子を含む。mGRR mRNAの脳特異領域分布は、正常な脳機能の調節におけるmGRRの重要性を示す。すなわち、これらのポリペプチドの発現、存在量または活性の異常は、広く多様な神経学的および/または精神医学的疾患、例えば限定はされないが痴呆症、精神分裂病、うつ病、情動障害、癲癇および運動障害をまねき得る。例えば、アルツハイマー病および他の痴呆症、例えば老年性記憶障害および多発脳梗塞性痴呆では、認知機能の喪失が脳における若干の神経伝達物質のレベル低下に伴う。ファミリー3GPCR、例えば代謝型グルタミン酸受容体およびGABA-B受容体はまたシナプス伝達を調節し、イオンチャンネルモジュレーターと比べて、それら

40

50

の作用は永続性があり、調節的である。これらの指標は全て、以後mGRR1a、mGRR1bまたはmGRR2の「生物活性」と称す。好ましくは、本発明のポリペプチドは、mGRR1a、mGRR1bまたはmGRR2に特有な少なくとも1つの生物活性を呈する。

【0029】

本発明ポリペプチドはまた、対立遺伝子形態およびスプライス変異型を含め、前述のポリペプチドの変異型を含む。上記ポリペプチドは、挿入、欠失および同類的または非同類的であり得る置換またはそれらの組み合わせにより対照基準ポリペプチドから変化している。

【0030】

本発明ポリペプチドの好ましいフラグメントには、配列番号2、配列番号4または配列番号6のアミノ酸配列からの少なくとも30、50または100連続アミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチド、または配列番号2、配列番号4または配列番号6のアミノ酸配列から先頭化または欠失された少なくとも30、50または100連続アミノ酸を有するアミノ酸配列を含む単離ポリペプチドがある。好ましいフラグメントは、mGRRの生物活性を伝達する生物活性フラグメント、例えば類似活性または改善された活性を伴うかまたは望ましくない活性が低減化されたものである。また好ましいのは、動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性であるフラグメントである。

【0031】

本発明の配列番号4または配列番号6のヒトポリペプチドのフラグメントまたは変異型は、完全長ラットcDNAを単離するため低ストリンジェンシーハイブリダイゼーションにおいてラットまたはヒトDNA配列(配列番号1、配列番号3、配列番号5または配列番号16)を用いることにより対応する完全長ポリペプチドを製造するのに使用され得る。このcDNAにより、哺乳類発現系を用いてmGRRポリペプチドが生成され得る(実施例2参照)。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、ポリ核酸ハイブリッドが安定している条件をいう。上記条件は、当業者には明らかなものである。当業者に公知の通り、ハイブリッドの安定性は、ハイブリッドの融解温度(T_m)に反映され、配列相同性が1%減少するごとに約1~1.5%ずつ低下する。一般に、ハイブリッドの安定性は、ナトリウムイオン濃度および温度の関数である。典型的には、ハイブリダイゼーション反応を高ストリンジェンシー条件下で行ない、次いでストリンジェンシーを変えながら洗浄する。本明細書で使用されている高(い)ストリンジェンシーとは、65~68%、1Mの Na^+ 中で安定したハイブリッドを形成する核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能にする条件をいう。高ストリンジェンシー条件は、例えば6xSSC、5xデンハート、1%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、0.1ピロリン酸ナトリウムおよび0.1mg/ml変性サケ精液DNAを非特異的競合物質として含む水溶液中でのハイブリダイゼーションにより与えられ得る。ハイブリダイゼーション後、高ストリンジェンシー洗浄が幾つかの工程で行われ得、最終洗浄(約30分)は0.2~0.1xSSC、0.1%SDS中ハイブリダイゼーション温度で行なわれる。中程度のストリンジェンシーとは、上記溶液中ではあるが、約60~62%でのハイブリダイゼーションと均等内容の条件をいう。その場合、最終洗浄は、1xSSC、0.1%SDS中、ハイブリダイゼーション温度で行なわれる。低ストリンジェンシーとは、約50~52%で上記溶液中におけるハイブリダイゼーションと均等内容である条件をいう。その場合、最終洗浄は、2xSSC、0.1%SDS中においてハイブリダイゼーション温度で行なわれる。これらの条件は、様々な緩衝液、例えばホルムアミドベースの緩衝液および温度を用いて適合化およびデュプリケートされ得るものとする。デンハート溶液およびSSCは、他の適切なハイブリダイゼーション緩衝液の場合と同様当業界ではよく知られている(例えば、Sambrook et al編(1989)Molecular Cloning: A Laboratory Manual、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス、ニューヨークまたはAusubel et al編(1990)Current Protocols in Molecular Biology、ジョン・ワイリー・アンド・サンズ、インコーポレイテッド参照)。特に、若干のパラメーター、主として塩濃度および温度を改変することにより、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーが変えられ得ること、および得られた条件は上記

10

20

30

40

50

パラメーターを全て合わせた作用の結果であることは、当業者であれば容易に理解できるはずである。プローブの長さおよびGC含有率もまたある一定の役割を演じるため、最適なハイブリダイゼーション条件は経験的に決定されなければならない。

【0032】

本発明のポリペプチドは、「成熟」タンパク質の形態であり得るかまたは大型タンパク質、例えば前駆体または融合タンパク質の一部であり得る。分泌または先導配列、プロ配列、精製を助ける配列、例えば多ヒスチジン残基を含む追加アミノ酸配列、または組換え手順中安定させるための追加配列を含ませるのが多くの場合有利である。

【0033】

本発明のポリペプチドは、適切な方法で、例えば天然供給源から、発現系を含む遺伝子操作が加えられた宿主細胞(下記参照)からの単離により、または例えば自動ペプチド合成装置を用いた、化学的合成により、または上記方法の組み合わせにより製造され得る。上記ポリペプチド製造手段は、当業界では十分に理解されている。

【0034】

さらに別の態様において、本発明は、mGRRポリヌクレオチドに関するものである。上記ポリヌクレオチドは、以下のものを含む：

(a)配列番号1、配列番号3または配列番号5のポリヌクレオチド配列と少なくとも80%、90%、95%、98%または99%の同一性を有するポリヌクレオチド配列を含み、リガンド結合検定法においてmGRRと類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離mGRRポリヌクレオチド、

(b)配列番号1、配列番号3または配列番号5のポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチド、

(c)配列番号1、配列番号3または配列番号5のポリヌクレオチドと少なくとも80%、90%、95%、98%または99%の同一性を有し、リガンド結合検定法においてmGRRと類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、

(d)配列番号1、配列番号3または配列番号5の単離ポリヌクレオチド、

(e)配列番号1、配列番号3または配列番号5のポリペプチド配列と少なくとも80%、90%、95%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコード化するポリヌクレオチド配列を含み、リガンド結合検定法においてmGRRと類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、

(f)配列番号1、配列番号3または配列番号5のポリペプチドをコード化するポリヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、

(g)配列番号1、配列番号3または配列番号5のポリペプチド配列と少なくとも80%、90%、95%、98%または99%の同一性を有するポリペプチド配列をコード化するポリヌクレオチド配列を含み、リガンド結合検定法においてmGRRと類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、

(h)配列番号1、配列番号3または配列番号5のポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、

(i)配列番号1、配列番号3または配列番号5のポリヌクレオチド配列に対し0.80、0.90、0.95、0.98または0.99の同一性指数を有するポリヌクレオチド配列を含み、リガンド結合検定法においてmGRRと類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、または

(k)配列番号1、配列番号3または配列番号5のポリペプチド配列に対し0.80、0.90、0.95、0.98または0.99の同一性指数を有するポリペプチド配列をコード化するポリヌクレオチド配列を含み、リガンド結合検定法においてmGRRと類似した特性を示すポリペプチドをコード化する単離ポリヌクレオチド、または

(l)上述のポリヌクレオチドのフラグメントまたは変異型であるかまたはその全長にわたって上述のポリヌクレオチドと相補的であるポリヌクレオチド。

【0035】

本発明ポリヌクレオチドの好ましいフラグメントには、配列番号1、配列番号3または配

10

20

30

40

50

列番号5の配列からの少なくとも15、30、50または100連続ヌクレオチドを有するヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド、または配列番号1、配列番号3または配列番号5の配列から切頭化または欠失された少なくとも30、50または100連続ヌクレオチドを有する配列を含む単離ポリヌクレオチドがある。

【0036】

本発明ポリヌクレオチドの好ましい変異型には、スプライス変異型、対立遺伝子変異型、および1個またはそれ以上の一塩基多型(SNP)を有するポリヌクレオチドを含む多型がある。

【0037】

本発明ポリヌクレオチドはまた、配列番号2、配列番号4または配列番号6のアミノ酸配列を含むポリペプチド変異型をコード化するポリヌクレオチドを含む。 10

【0038】

さらに別の態様において、本発明は、本発明DNA配列のRNA転写物であるポリヌクレオチドを提供する。したがって、

(a)配列番号2、配列番号4または配列番号6のポリペプチドをコード化するDNA配列のRNA転写物を含むか、

(b)配列番号2、配列番号4または配列番号6のポリペプチドをコード化するDNA配列のRNA転写物であるか、

(c)配列番号1、配列番号3または配列番号5のDNA配列のRNA転写物を含むか、または 20

(d)配列番号1、配列番号3または配列番号5のDNA配列のRNA転写物であるか、または

(e)それらと相補的であるRNAポリヌクレオチド

を含むRNAポリヌクレオチドが提供される。

【0039】

配列番号2、配列番号4または配列番号6のポリペプチドは、GPCR-LYMS Tとの相同性および/または構造類似性を有する、Gタンパク質共役受容体ファミリーの他のタンパク質と関係がある(Jensen, C.P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 4816 - 4820, 1994)。

【0040】

本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、特に、それらの相同性ポリペプチドおよびポリヌクレオチドと類似した生物学的機能/特性を有すると予測される。さらに、本発明の好ましいポリペプチドおよびポリヌクレオチドは、mGRRの少なくとも一活性を有する。 30

【0041】

本発明のポリヌクレオチドは、哺乳類脳の細胞におけるmRNAから誘導されたcDNAライブラリーからの標準クローニングおよびスクリーニング技術を用いて得られる(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク(1989)参照)。本発明ポリヌクレオチドはまた、天然供給源、例えばゲノムDNAライブラリーから得られるか、または公知市販技術を用いて合成され得る。 40

【0042】

本発明ポリヌクレオチドを本発明ポリペプチドの組換え的製造に使用するとき、ポリヌクレオチドは、成熟ポリペプチドについてのコーディング配列を単独で、または他のコーディング配列、例えば先導または分泌配列、プレ-またはプロ-またはプレプロ-タンパク質配列、または他の融合ペプチド部分をコード化する配列との読み枠における成熟ポリペプチドについてのコーディング配列を含み得る。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列がコード化され得る。本発明のこの態様のある種の好ましい例において、マーカー配列は、pQEベクター(キアゲン、キアゲンAG、バーゼル、スイス国)で提供され、Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA(1989)86: 821 - 824に記 50

載されているヘキサ - ヒスチジンペプチド、またはHA標識である。ポリヌクレオチドはまた、非コーディング5'および3'配列、例えば転写された、非翻訳配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位およびmRNAを安定させる配列を含み得る。

【0043】

配列番号1、配列番号3または配列番号5のポリヌクレオチド配列と同一であるか、または十分な同一性を有するポリヌクレオチドは、cDNAおよびゲノムDNA用ハイブリダイゼーションプローブとしてまたは核酸増幅反応(例えばPCR)用プライマーとして使用され得る。上記プローブおよびプライマーは、本発明ポリペプチドをコード化する完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離し、配列番号1、配列番号3または配列番号5との高い配列類似性、典型的には少なくとも95%の同一性を有する他の遺伝子(ヒト供給源からのパラログおよびヒト以外の種からのオーソログおよびパラログをコード化する遺伝子を含む)のcDNAおよびゲノムクローンを単離するのに使用され得る。好ましいプローブおよびプライマーは、一般的に少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは30ヌクレオチドを含み、少なくとも50、さもなければ少なくとも100ヌクレオチドを有し得る。特に好ましいプローブは、30~50のヌクレオチドを有する。特に好ましいプライマーは、20~25のヌクレオチドを有する。

10

【0044】

ヒト以外の種からの相同体を含む、本発明ポリペプチドをコード化するポリヌクレオチドは、配列番号1、配列番号3または配列番号5の配列または好ましくは少なくとも15ヌクレオチドのそのフラグメントを有する標識プローブによりストリンジェントハイブリダイゼーション条件下でライブラリーをスクリーニングし、上記ポリヌクレオチド配列を含む完全長cDNAおよびゲノムクローンを単離する工程を含む方法により得られる。上記ハイブリダイゼーション技術は当業者には公知である。好ましいストリンジェントハイブリダイゼーション条件は、50%ホルムアミド、5xSSC(150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH7.6)、5xデンハート溶液、10%デキストランスルフェート、および20マイクログラム/mlの変性剪断サケ精液DNAを含む溶液中42°Cでの一晚インキュベーション、次いで約65°Cでの0.1xSSC中におけるフィルター洗浄を含む。すなわち本発明はまた、配列番号1、配列番号3または配列番号5の配列または好ましくは少なくとも15ヌクレオチドのそのフラグメントを有する標識プローブでのストリンジェントハイブリダイゼーション条件下におけるライブラリーのスクリーニングにより得られる、好ましくは少なくとも100のヌクレオチド配列を伴う、単離ポリヌクレオチドを含む。ヒトおよび(部分的)ラット配列は、ヌクレオチドレベルで89%の同一性およびアミノ酸レベルで89%の同一性および90%の類似性を示す。

20

30

【0045】

当業者であれば、多くの場合、ポリペプチドをコードする領域は5'末端まで完全に伸びているわけではないという点で、単離cDNA配列は不完全であることが容易に理解できるはずである。これは、逆転写酵素、すなわち本質的に「プロセシビティー」(酵素が重合反応中鋳型に結合したままに能力の尺度)が低く、第1鎖cDNA合成中にmRNA鋳型のDNAコピーを完了し得ない酵素の結果である。

40

【0046】

完全長cDNAを得るかまたは短いcDNAを伸長させる、当業者に利用可能であって熟知されている幾つかの方法があり、例えばcDNA末端の急速増幅(RACE)法に基づく方法がある(例えば、Frohman et al., Proc Nat Acad Sci USA 85, 8998-9002, 1988参照)。例えばMARTHON技術(クロンテック・ラボラトリーズ、インコーポレイテッド、BDクロンテック、パーゼル、スイス国)が典型的に示すように、最近の技術改良により、長いcDNAについての検索は著しく簡易化された。MARTHON技術では、選ばれた組織から抽出されたmRNAからcDNAを調製し、「アダプター」配列を各端部にライゲーションした。次いで、核酸増幅(PCR)を実施することによ

50

り、遺伝子特異的およびアダプター特異的オリゴヌクレオチドプライマーの組み合わせを用いてcDNAの「失われた」5'末端を増幅する。次いで、「内側の」プライマー、すなわち増幅産物内でアニーリングするよう設計されたプライマー(典型的にはアダプター配列においてさらなる3'をアニーリングするアダプター特異的プライマーおよび既知遺伝子配列においてさらなる5'をアニーリングする遺伝子特異的プライマー)を用いて、PCR反応を反復する。次いで、この反応の生成物をDNA配列決定により解析し、生成物を既存のcDNAに直接結合させて完全配列を得るか、または5'プライマーの設計に関する新たな配列情報を用いて別々の完全長PCRを実施することにより、完全長cDNAが構築され得る。

【0047】

本発明の組換えポリペプチドは、発現系を含む遺伝子操作が加えられた宿主細胞から当業界でよく知られている方法により調製され得る。したがって、さらに別の態様において、本発明は、本発明の一ポリヌクレオチドまたは複数ポリヌクレオチドを含む発現系、上記発現系により遺伝子操作が加えられた宿主細胞および組換え技術による本発明ポリペプチドの製法に関するものである。無細胞翻訳系もまた、本発明のDNA構築物から誘導されたRNAを用いて上記タンパク質を製造するのに使用され得る。

【0048】

組換え体を製造するため、宿主細胞には、本発明ポリヌクレオチドについての発現系またはその一部を組み込むように遺伝子操作が加えられ得る。ポリヌクレオチドは、多くの標準的実験マニュアル、例えばDavis et al., Basic Methods in Molecular Biology(1986)およびSambrook et al.(同書)に記載された方法により宿主細胞に導入され得る。

【0049】

宿主細胞へのポリヌクレオチドの好ましい導入方法には、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン介在トランスフェクション、トランスフェクション、顕微注入、カチオン性脂質介在トランスフェクション、電気穿孔、形質導入、切屑(スクレープ)ローディング、弾道導入または感染がある。

【0050】

適切な宿主細胞の代表例には、細菌細胞、例えばストレプトコッカス(Streptococci)、スタフィロコッカス(Staphylococci)、エシェリキア・コリ(E.coli)、ストレプトマイシス(Streptomyces)およびバシラス・サチリス(Bacillus subtilis)細胞、真菌細胞、例えば酵母細胞およびアスペルギルス(Aspergillus)細胞、昆虫細胞、例えばショウジョウバエ(ドロソフィラ、Drosophila)S2およびスポドプテラ(Spodoptera)Sf9細胞、動物細胞、例えばCHO、COS、ヒーラ、C127、3T3、BHK、HEK293およびボーズ黒色腫細胞および植物細胞がある。

【0051】

非常に多様な発現系、例えば染色体、エピソームおよびウイルス由来の系、例えば細菌性プラスミド、バクテリオファージ、トランスポゾン、酵母エピソーム、挿入エレメント、酵母染色体エレメント、ウイルス、例えばバクテリオウイルス、パポバウイルス、例えばSV40、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスから誘導されたベクター、およびそれらの組み合わせから誘導されたベクター、例えばプラスミドおよびバクテリオファージ遺伝子エレメント、例えばコスミドおよびファージミドから誘導されたものが使用され得る。発現系は、発現を調節し、生じさせる制御領域を含み得る。一般的に、宿主においてポリヌクレオチドを維持、増殖または発現することにより、ポリペプチドを生産し得る系またはベクターであれば全て使用され得る。適切なポリヌクレオチド配列は、様々な公知常用技術のいずれか、例えばSambrook et al(上記参照)に示されたものにより発現系へ挿入され得る。適切な分泌シグナルを所望のポリペプチドへ組み込むことにより、小胞体のルーメン、周辺腔または細胞外環境への翻訳されたタンパク質の分泌が行われ得る。これらのシグナルは、ポリペプチドにとって内在的であり得るかまたはそれらは異種シグナルであり得る。

【0052】

10

20

30

40

50

本発明ポリペプチドをスクリーニング検定で使用するために発現させる場合、一般的にポリペプチドは細胞表面で生産されるのが好ましい。この事象において、細胞は、スクリーニング検定で使用する前に採取され得る。ポリペプチドが培地へ分泌される場合、培地を採取することにより、ポリペプチドが採取および精製され得る。細胞内で製造する場合、ポリペプチドを採取する前にまず細胞を溶解しなければならない。

【0053】

本発明ポリペプチドは、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈澱、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティー・クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレシチンクロマトグラフィーを含む公知方法により組換え細胞培養物から採取および精製され得る。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィーを精製に使用する。ポリペプチドが細胞内合成、単離および/または精製中に変性したとき、公知タンパク質再生技術を用いることにより活性立体配座が復元され得る。

10

【0054】

本発明ポリヌクレオチドは、関連遺伝子における突然変異の検出を通して診断試薬として使用され得る。cDNAまたはゲノム配列において配列番号1、配列番号3または配列番号5のポリヌクレオチドを特徴とし、機能不全に伴う遺伝子の突然変異形態の検出は、遺伝子の発現不足、過剰発現または空間的または時間的発現の改変から生じる病気または病気に対する感受性の診断に加えられるかまたはそれを特定し得る診断道具を提供する。遺伝子に突然変異をもつ個体は、当業界で公知の様々な技術によりDNAレベルで検出され得る。

20

【0055】

診断用核酸は、対象の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織生検または剖検材料から入手され得る。ゲノムDNAは検出に直接使用され得るか、またはそれは、PCR、好ましくはRT-PCRの使用により酵素的に、または他の増幅技術により分析前に増幅され得る。RNAまたはcDNAもまた同様に使用され得る。検出および挿入は、正常表現型と比べた増幅産物の大きさの変化により検出され得る。点突然変異は、増幅DNAを標識mGRRヌクレオチド配列とハイブリダイズさせることにより同定され得る。完全対合配列は、リボヌクレアーゼ消化または融解温度差により誤対合二重らせんとは区別され得る。

【0056】

DNA配列差異はまた、変性剤の存在または非存在下でのゲルにおけるDNAフラグメントの電気泳動移動性の改変により、または直接DNA配列決定により検出され得る(例えば、Myers et al, Science(1985)230:1242)。特異位置での配列変化はまた、ヌクレアーゼ保護検定法、例えばリボヌクレアーゼおよびS1保護または化学的開裂方法により示され得る(Cotton et al., Proc Natl Acad Sci USA(1985)85:4397-4401参照)。

30

【0057】

mGRRポリヌクレオチド配列またはそのフラグメントを含むオリゴヌクレオチドプローブのアレイを構築することにより、例えば遺伝子突然変異の有効なスクリーニングが実施され得る。上記アレイは、好ましくは高密度アレイまたはグリッドである。アレイ技法は、公知で一般的適用性を有しており、遺伝子発現、遺伝的連鎖および遺伝的変異性を含む分子遺伝学における様々な問題と取組むのに使用され得る。例えばM.Chee et al., Science, 274, 610-613(1996)およびそこに引用された他の参考文献参照。

40

【0058】

ポリペプチドまたはmRNA発現レベルの異常な減少または増加の検出もまた、対象の本発明疾患易罹患性の診断または測定に使用され得る。発現の減少または増加は、ポリヌクレオチドの定量に関する当業界で公知の方法、例えば核酸増幅、例えばPCR、RT-PCR、リボヌクレアーゼ保護、ノーザンブロッティングおよび他のハイブリダイゼーション方法のいずれかを用いてRNAレベルで測定され得る。宿主から誘導された試料中における、タンパク質、例えば本発明ポリペプチドのレベル測定に使用され得る検定技術は、

50

当業者には公知である。上記検定方法には、ラジオイムノアッセイ、競争的結合検定法、ウエスタン・プロット分析およびE L I S A検定法がある。

【0059】

すなわち別の態様において、本発明は、以下のものを含む診断キットに関するものである：

(a)本発明ポリヌクレオチド、好ましくは配列番号1、配列番号3または配列番号5のヌクレオチド配列、またはそのフラグメントまたはRNA転写物、

(b)(a)の配列と相補的なヌクレオチド配列、

(c)本発明ポリペプチド、好ましくは配列番号2、配列番号4または配列番号6のポリペプチドまたはそのフラグメント、または

(d)本発明ポリペプチド、好ましくは配列番号2、配列番号4または配列番号6のポリペプチドに対する抗体。

10

【0060】

上記キットにおいて、(a)、(b)、(c)または(d)は、本質的な成分を含み得るものとする。かかるキットは、疾患または易罹患性、中でも特に本発明の疾患の診断において有用である。

【0061】

本発明ポリヌクレオチド配列は染色体局在性試験にとって貴重である。本発明配列は、個々のヒト染色体における特定位置を特異的にターゲティングし、それとハイブリダイズし得る。本発明による染色体への関連配列のマッピングは、遺伝子関連疾患とそれらの配列の相互関係を明らかにする上での重要な第一段階である。一旦配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体における配列の物理的位置と遺伝地図データとの相互関係が明らかにされ得る。上記データは、例えばV.McKusick、Mendelian Inheritance in Man (ジョン・ホブキンス・ユニバーシティー・ウェルチ・メディカル・ライブラリーを通じてオンライン入手可能)から見出される。次いで、同じ染色体領域にマッピングされた遺伝子および疾患間の関係は、連鎖分析(物理的隣接遺伝子の共遺伝)を用いて同定される。ゲノム配列(遺伝子フラグメントなど)についての正確なヒト染色体局在性は、放射能ハイブリッド(RH)マッピング(Walter, M. et al., (1994) A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes, Nature Genetics 7, 22 - 28)を用いて測定され得る。若干のRHパネル、例えばGene Bridge 4 RHパネル(Gyapay G et al., Hum Mol. Genet. 1996年3月, 5(3): 339 - 46)がリサーチ・ジェネティクス(ハンツビル、アラバマ、米国)から入手できる。このパネルを用いて遺伝子の染色体位置を測定するため、RH DNAにおいて興味の対象である遺伝子から設計されたプライマーを用いて93のPCRを遂行する。これらのDNAは各々、ハムスターバックグラウンド(ヒト/ハムスターハイブリッドセルライン)で維持されたランダムなヒトゲノムフラグメントを含む。これらのPCRの結果、興味の対象である遺伝子のPCR産物の存在または非存在を示す93のスコアが得られる。これらのスコアを、既知位置のゲノム配列からのPCR産物を用いて得られたスコアと比較する。この比較は、<http://www.genome.wi.mit.edu/>で行なわれる。

20

30

【0062】

本発明ポリヌクレオチド配列はまた、組織発現試験用の貴重な道具である。上記試験により、組織でコード化されたポリペプチドの発現パターンに関する指標を与え得る本発明ポリヌクレオチドの発現パターンが、それらをコード化するmRNAを検出することにより測定され得る。使用される技術は当業界では公知であり、グリッド上に整列させたクローンへのin situハイブリダイゼーション技術、例えばcDNAマイクロアレイ・ハイブリダイゼーション(Schena et al., Science, 270, 467 - 470, 1995およびShalon et al., Genomes Res., 6, 639 - 645, 1996)およびヌクレオチド増幅技術、例えばPCRが含まれる。好ましい方法は、パーキン・エルマーから入手できるTAMMAN(登録商標)技術を使用する。これらの試験により得られた結果は、生物体におけるポリペプチドの正常機能の指標を提供し得る。さらに、mRNAの正常発現パターンと同

40

50

じ遺伝子の代替形態(例えば、ポリペプチドコーディング可能性の改変または調節的突然変異を有するもの)によりコード化されたmRNAのそれとの比較試験は、本発明ポリペプチドの役割、または疾患におけるその不適切な発現の場合についての貴重な洞察を提供し得る。上記の不適切な発現は、時間的、空間的または単に定量的性質を有し得る。

【0063】

染色体局在性はまた、公開ドメインデータベース、例えばENSEMBL(<http://www.ensembl.org/>)を用いて推論され得る。ヒト染色体10p11.2 - p12でのヒトmGRR1遺伝子地図、ヒト染色体Chr17q11.1でのヒトmGRR2遺伝子地図。

【0064】

本発明の別の態様は抗体に関するものである。本発明ポリペプチドまたはそれらのフラグメント、またはそれらを発現する細胞は、本発明ポリペプチドに免疫特異的である抗体を製造するための免疫原として使用され得る。「免疫特異的」の語は、抗体が、先行技術における他の関連ポリペプチドに対する親和力よりも本発明ポリペプチドに対して実質的に大きい親和力を有することを意味する。本発明ポリペプチドに対して産生した抗体は、常用プロトコルを用いて、ポリペプチドまたはエピトープ担持フラグメント、または細胞を動物、好ましくはヒト以外の動物に投与することにより得られる。モノクローナル抗体の製造については、連続セルライン培養物により製造される抗体を提供する技術であれば全て使用され得る。例としては、ハイブリドーマ技術(Kohler, G.およびMilstein, C., *Nature* (1975) 256: 495 - 497)、トリオーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al. *Immunology Today* (1983) 4: 72)およびEBV - ハイブリドーマ技術(Cole et al. *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 77 - 96, Alan R. Liss, Inc. 1985)がある。

10

20

30

40

【0065】

1本鎖抗体の製造技術、例えば米国特許第4946778号記載のものはまた、この発明のポリペプチドに対する1本鎖抗体の製造に適合化され得る。また、トランスジェニックマウスまたは他の生物体、例えば他の哺乳類もヒト化抗体の発現に使用され得る。

【0066】

上記抗体は、ポリペプチドを発現するクローンの単離または同定、またはアフィニティー・クロマトグラフィーによるポリペプチドの精製に使用され得る。本発明ポリペプチドに対する抗体はまた、特に本発明疾患の処置に使用され得る。

【0067】

本発明ポリペプチドおよびポリヌクレオチドはまた、ワクチンとしても使用され得る。したがって、別の態様において、本発明は、哺乳類における免疫学的応答の誘導方法であって、例えばサイトカイン生産性T細胞または細胞傷害性T細胞を含め、抗体産生および/またはT細胞免疫応答の誘導に十分なだけの本発明ポリペプチドを哺乳類に接種することにより、病気が個体内で既に確立されているにせよ、されていないにせよ、動物を病気から保護することを含む方法に関するものである。哺乳類における免疫学的応答はまた、インピボでポリヌクレオチドの発現を指令し、ポリペプチドをコードするベクターを介して本発明ポリペプチドを送達することを含む方法により誘導され得、かかる免疫学的応答の誘導により抗体が産生し、本発明の病気から動物を保護し得る。ベクターの一投与方法は、粒子上のコーティングとしてまたは他の形で所望の細胞へそれを加速することによるものである。上記核酸ベクターは、DNA、RNA、修飾核酸、またはDNA/RNAハイブリッドを含み得る。使用する場合、ワクチン、ポリペプチドまたは核酸ベクターは、通常、ワクチン処方物(組成物)として提供される。処方物は、さらに適切な担体を含み得る。ポリペプチドは胃で分解され得るため、それは好ましくは非経口的(例えば皮下、筋肉内、静脈内または皮内注射)に投与される。非経口投与に適切な処方物は、酸化防止剤、緩衝液、静菌剤および処方物を受容体の血液と等張性にする溶質を含み得る水性および非水性滅菌注射溶液、並びに懸濁剤または増粘剤を含み得る水性および非水性滅菌懸濁液を含む。

【0068】

50

処方物は、単位用量または多用量容器、例えば密閉アンプルおよびバイアルの形を呈し得、使用直前に滅菌液体担体を加えるだけでよい凍結乾燥状態で貯蔵され得る。ワクチン製剤はまた、処方物の免疫原性を高めるアジュバント系、例えば水中油滴系および当業界で公知の他の系を含み得る。用量は、ワクチンの比活性により異なり、常用実験により容易に測定され得る。

【0069】

本発明ポリペプチドは、1種またはそれ以上の病的状態、特に上述の本発明疾患において関連性がある1つまたはそれ以上の生物学的機能を有する。したがって、ポリペプチドの機能またはレベルを刺激または阻害する化合物を同定することは有用である。したがって、さらに別の態様において、本発明は、ポリペプチドの機能またはレベルを刺激または阻害するものを同定するための化合物のスクリーニング方法を提供する。上述した通り、上記方法は、本発明の上記疾患に関する治療および予防目的に使用され得るアゴニストまたはアンタゴニストを同定する。化合物は、様々な供給源、例えば細胞、無細胞調製物、化学的ライブラリー、化学的化合物のコレクション、および天然産物混合物から同定され得る。かくして同定された上記アゴニストまたはアンタゴニストは、場合によってはポリペプチドの天然または修飾基質、リガンド、受容体、酵素など、その構造的または機能的ミメティック(模倣物質)(Coligan et al., Current Protocols in Immunology 1(2):第5章(1991)参照)または小分子であり得る。

10

【0070】

スクリーニング方法では、候補化合物に直接的または間接的に随伴させた標識手段により、ポリペプチド、またはポリペプチドを担持する細胞または膜、またはその融合タンパク質への候補化合物の結合を単に測定すればよい。別法として、スクリーニング方法は、標識した競争相手(例、アゴニストまたはアンタゴニスト)に対するポリペプチドへの候補化合物の競争的結合の測定または検出(定性的または定量的)を含み得る。さらに、これらのスクリーニング方法によると、ポリペプチドを担持する細胞に適切な検出系を用いることにより、候補化合物が、ポリペプチドの活性化または阻害により発せられるシグナルを誘導するか否かが試験され得る。活性化の阻害剤は、一般的に既知アゴニストの存在下で検定され、候補化合物の存在によるアゴニストによる活性化に対する影響が観察される。さらに、スクリーニング方法は、単に、本発明ポリペプチドを含む溶液と候補化合物を混合して混合物を形成させ、混合物中におけるHGR L101活性を測定し、そして混合物のHGR L101活性を、候補化合物を含まない対照混合物と比較する工程を含むだけである。

20

30

【0071】

本発明のポリペプチドは、慣用的低受容力スクリーニング方法および高スループットスクリーニング(HTS)フォーマットでも使用され得る。上記HTSフォーマットは、96ウェル、さらに細菌では384ウェルのマイクロタイタープレートの十分に確立された使用だけでなく、新たに開発された方法、例えばSchlлек et al., Anal Biochem., 246, 20-29(1997)により報告されたナノウェル方法を含む。

【0072】

同じく前記の通り、融合タンパク質、例えばFc部分およびmGRRポリペプチドからつくられたものを、高スループットスクリーニング検定法に使用することにより、本発明ポリペプチドについてのアンタゴニストが同定され得る(D.Bennett et al., J Mol Recognition, 8:52-58(1995)およびK.Johanson et al., J Biol Chem, 270(16):9459-9471(1995))。

40

【0073】

また、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチドおよびポリペプチドに対する抗体を用いることにより、細胞におけるmRNAおよびポリペプチドの生産に対する添加化合物の効果を検出するためのスクリーニング方法が形成され得る。例えば、ELISA検定法は、当業界で公知の標準的方法によりモノクローナルおよびポリクローナル抗体を用いてポリペプチドの分泌または細胞会合レベルを測定するために構築され得る。これを用いること

50

により、適切に遺伝子操作された細胞または組織からのポリペプチド製造を阻害または促進し得る薬剤(それぞれアンタゴニストまたはアゴニストとも呼ばれる)が発見され得る。

【0074】

本発明ポリペプチドは、当業界で公知の標準的受容体結合技術を通じて膜結合または可溶性受容体がある場合それらを同定するのに使用され得る。これらには、限定されるわけではないがリガンド結合および架橋検定法があり、それらの検定法ではポリペプチドを放射性同位元素(例えば¹²⁵I)により標識するか、化学的修飾(例えばビオチニル化)を加えるか、または検出または精製に適切なペプチド配列に融合させ、推定的受容体の供給源(細胞、細胞膜、細胞上清、組織抽出物、体液)とインキュベーションする。他の方法には、生物物理学的技術、例えば表面プラスモン共鳴および分光器の使用がある。また、これらのスクリーニング方法を用いることにより、ポリペプチドのその受容体への結合で競合するポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストがある場合それらが同定され得る。上記検定法の標準的実施方法は、当業界では十分に理解されている。

10

【0075】

本発明ポリペプチドのアンタゴニストの例には、抗体または場合によってはオリゴヌクレオチドまたはタンパク質があり、それらは場合によってはポリペプチドのリガンド、基質、受容体、酵素等と密接に関連したもので、例えばリガンド、基質、受容体、酵素等のフラグメント、またはポリペプチドの活性が阻止されるように本発明ポリペプチドに結合はするが、応答を発しない小分子がある。

【0076】

スクリーニング方法はまた、トランスジェニック技術およびmGRR遺伝子の使用を含み得る。トランスジェニック動物の構築技術は十分に確立されている。例えば、mGRR遺伝子は、受精した卵母細胞の雄前核への顕微注入、着床前または着床後胚へのレトロウイルス移入、または例えば電気穿孔による遺伝的に修飾された胚性幹細胞の宿主胚盤胞への注入を通じて導入され得る。特に有用なトランスジェニック動物は、動物遺伝子とその動物のゲノム内でヒト均等内容遺伝子により置きかえられた、いわゆる「ノックイン」動物である。ノックイントランスジェニック動物は、化合物がヒト標的に特異的である場合、薬剤送達プロセスにおける標的確認について有用である。他の有用なトランスジェニック動物は、細胞において内在性DNA配列によりコード化された本発明ポリペプチドの動物オーソログの発現が部分的または完全に無効にされた、いわゆる「ノックアウト」動物である。遺伝子ノックアウトは、特異的細胞または組織にターゲティングされ得るか、技術の限界の結果としてある種の細胞または組織でのみ行われ得るか、または動物における全てまたは実質的に全ての細胞で行われ得る。トランスジェニック動物技術はまた、導入遺伝子を発現させることにより、大量の本発明ポリペプチドが得られる動物総体発現クローニング系を提供する。

20

30

【0077】

上記方法で使用されるスクリーニングキットは、本発明のさらに別の態様を構成する。上記スクリーニングキットは、

- (a)本発明ポリペプチド、
- (b)本発明ポリペプチドを発現する組換え細胞、
- (c)本発明ポリペプチドを発現する細胞膜、または
- (d)本発明ポリペプチドに対する抗体

40

を含むもので、上記ポリペプチドは、好ましくは配列番号2、配列番号4または配列番号6の配列を有するものとする。

上記キットにおいて、(a)、(b)、(c)または(d)は、本質的な成分を含み得るものとする。

【0078】

本明細書で引用されている、限定はされないが特許および特許出願を含む出版物および参考文献は全て、個々の各出版物または参考文献が完全に示された形で具体的および個々に引用されているのと同じ効果をもつものとして出典明示で援用する。この出願が優先権を

50

主張している特許出願についてもまた、出版物および参考文献について上述したのと同様に
出典明示で援用する。

【実施例】

【0079】

以下、実施例により本発明を説明する。

実施例1：ヒトmGRR1aおよびヒトmGRR1bのクローニング

Celeraヒトゲノムデータベースのtblastn検索における問い合わせとしてGABA-B受容体(受入番号Y10370、AJ011318)のアミノ酸配列を用いることにより、同定された配列(GA__15234422)は、GABA-Bおよび代謝型グルタミン酸受容体の推定貫膜ドメインとの類似性は限られていた。

10

【0080】

クローニングするため、本質的に製造業者による記載内容にしたがって、クロンテックの Marathon RACE cDNA(ヒト脳、カタログ番号7400-1、BDクロンテック、バーゼル、スイス国)を用いて対応するcDNA 5'-および3'-RACE反応を遂行する。クロンテックから購入(カタログ番号6543-1)したポリA(+)RNA(全ヒト脳)からcDNAを転写する。製造業者の使用説明書にしたがって、GIBCO-BRL cDNA合成モジュール(ライフ・テクノロジーズ、バーゼル、スイス国)を使用する。オリゴ(dT)およびランダムプライマーの両方を別々の反応(2.5 μgの各RNA、20 μl)で用いて1本鎖cDNAを合成する。PCRで使用する前、10 mMのトリス、1 mMのEDTA pH 8.5 (TE)を、cDNA合成反応物に加えて最終量を100 μlとする。MWGプライマスサイクラーでPCRを実施する。オリゴ(dT)およびランダムプライマーcDNA合成反応物からの均等量を合わせる。1 μlのcDNA混合物を、50 μl PCR反応で使用する(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク(1989))。

20

【0081】

配列GA__15234422から設計されたRACEプライマーは、5-RACE: 5-gcg ggg ctc atg gaa tgc cga tgg gac-3(配列番号9)および3-RACE: 5-gtc cca tcg gca ttc cat gag ccc cgc-3(配列番号10)である。MWGバイオテックサイクラーで35サイクル(初回変性95 で3秒間、95 で30秒間(変性)、72 で4分間(アニーリングおよび伸長))実行する。クロンテックMarathon RACEキット説明書で概説されている有利なポリメラーゼを使用する。Marathon cDNAキットにより供給されたAP2プライマーと一緒に使用される内側遺伝子特異的プライマーセット(5-RACE: 5-cgc cac tgc ata gca gag ata aac acc-3(配列番号7)および3-RACE: 5-caa tga gct cat cat ctc tgc tat att cc-3(配列番号8))を用いて、2回目のPCR増幅工程を実行する。上記条件を用いて30 PCRサイクルを実行する。RACEクローンを、pCR II-topo(インビトロゲン、グロニンゲン、オランダ国)へサブクローニングし、配列決定する。公開ドメインデータベース(genbank)のtblastn検索により、3'-RACE配列の一部は、先に公開された配列、KIAA1136(受入番号AB032962)と同一であることが観察される。この配列は、脳からクローン化された未知機能の部分的cDNA配列としてgenbankに提出された。

30

40

【0082】

RACEクローンから得られた配列情報を用いて、全読み枠をクローン化するためのプライマー配列を設計する。mGRR1aに使用されるPCRプライマーは、5-CAC Cat ggc tta ccc ctt act cct ctg c-3(配列番号11)および5-cgt tgt tgc tct tgc ccc cct ggt cct c-3'(配列番号12)である。5'-プライマーは、最小Kozak共通配列CAC C(Kozak, Nucl Acid Res., 1987, 15, 8125-8132)を推定開始コドン上流に含む。mGRR1b用のプライマーは、5'-gtg gga cca gct gtg ctg cca ttg atc-3'(配列番号13)および5'-cgt tgt tgc tct tgc ccc cct ggt cct c-3'(配列番号14)である。鋳型として1 μlの全ヒト脳cDNA混合物(上記)を用いて、35 PCRサイクルを

50

実行する：初回変性 95 で 3 秒間、95 で 30 秒間(変性)、65 で 30 秒間、72 で 8 分間。プロメガ(ヴァリセレン、スイス国)からの校正 P f u ポリメラーゼを使用する。c D N A を配列決定し(配列番号 1、配列番号 3)、哺乳類発現ベクター(p c D N A 3.1 - t o p o、インビトロゲン)へ挿入する。

【 0 0 8 3 】

本発明の一ポリペプチド(m G R R 1 a、対応する D N A 配列、配列番号 1)は、1 2 1 2 アミノ酸(配列番号 2)のタンパク質についての読み枠を含む。推定シグナルペプチド配列(MAYPLLLCLLLAQLGLG(配列番号 1 5))が、配列番号 2 の N 末端そのものに位置することから、N 末端タンパク質配列は細胞外に位置することが示唆される。m G R R 1 b と呼ばれる m G R R 1 の N - 末端スプライス変異型に対応する配列(配列番号 4)は、1 1 8 3 アミノ酸(配列番号 5)の読み枠を含む。演繹されたタンパク質配列は、ファミリー 3 G タンパク質共役受容体に特有な構造的特徴を有する。すなわち、1)疎水性プロットは、7 つの推定貫膜ドメインをもつタンパク質を予測させる。2)ファミリー 3 G P C R との類似性は、b l a s t p 検索(推定貫膜領域の局所アラインメント)により実証されている：ドロソフィラ・メラノガスター(*drosophila melanogaster*)代謝型グルタミン酸受容体(受入番号 P 9 1 6 8 5)と比較すると、m G R R 1 a については 2 1 % の同一性および 4 5 % の類似性を示す残基が見出される。推定ドロソフィラ・メラノガスター(*drosophila melanogaster*)(推定)代謝型 G A B A - B 受容体サブタイプ 3 (受入番号 A F 3 1 8 2 7 4、推定貫膜領域の局所アラインメント)と比較すると、m G R R 1 a については 2 2 % の同一性および 4 3 % の類似性を示す残基が見出される。ショウジョウバエ(ドロソフィラ、*drosophila*)ゲノムにおいて m G R R 1 a に最も近い相同体は、推定遺伝子産物 C G 1 1 9 2 3 (フライベース受入番号 F B g n 0 0 3 1 6 4 2)であり、2 7 % の同一性および 4 3 % の類似性を示す残基を有する(C G 1 1 9 2 3 の残基 1 0 9 - 5 8 8 を伴う配列番号 2 の b l a s t p 局所アラインメント残基 2 4 1 - 7 4 5)。C G 1 1 9 2 3 の機能は、G タンパク質共役受容体として分類された。公開ドメインデータベースにおいて最も近い哺乳類 G P C R 相同体は、代謝型グルタミン酸受容体 3 型(受入番号 Q 1 4 8 3 2)であり、2 3 % の同一性および 4 1 % の類似性を示す残基をもつ(m G l u R 3 の残基 5 4 0 - 8 0 1 を伴う配列番号 2 の局所アラインメント残基 3 8 5 - 6 4 0)。ファミリー 3 G P C R との m G R R の類似性は、推定貫膜スパンニング領域に限定される。m G R R の N - 末端推定的細胞外ドメインについても、C - 末端推定的細胞内ドメインについても、既知タンパク質との顕著な類似性は見出されない。

【 0 0 8 4 】

【表 1】

貫膜ドメイン	位置(配列番号 2)	長さ
I	415-437	23
II	447-469	23
III	483-505	23
IV	523-545	23
V	580-602	23
VI	618-640	23
VII	647-669	23

表 2 : m G R R 1 a の推定貫膜領域

【 0 0 8 5 】

実施例 2 : ヒト m G R R 2 のクローニング

C e l e r a ヒトゲノムデータベースの t b l a s t n 検索における問い合わせとして G A B A - B 受容体 (受入番号 Y 1 0 3 7 0、A J 0 1 1 3 1 8) のアミノ酸配列を用いることにより、同定された配列 (G A _ 1 5 0 9 1 9 5 5) は、G A B A - B および代謝型グルタミン酸受容体の推定貫膜ドメインとの類似性が限られていた。

【 0 0 8 6 】

クローニングするため、本質的に製造業者による説明にしたがって、クロンテックの M a r a t h o n R A C E c D N A (ヒト脳、カタログ番号 7 4 0 0 - 1、B D クロンテック、パーゼル、スイス国) を用いて対応する c D N A 5' - および 3' - R A C E 反応を遂行する。クロンテックから購入 (カタログ番号 6 5 4 3 - 1) したポリ A (+) R N A (全ヒト脳) から c D N A を転写する。製造業者の使用説明書にしたがって、G I B C O - B R L c D N A 合成モジュール (ライフ・テクノロジーズ、パーゼル、スイス国) を使用する。オリゴ (d T) およびランダムプライマーの両方を別々の反応 (2.5 μ g の各 R N A、2 0 μ l) で用いて 1 本鎖 c D N A を合成する。P C R で使用する前、1 0 m M の トリス、1 m M の E D T A p H 8.5 (T E) を、c D N A 合成反応物に加えて最終量を 1 0 0 μ l とする。M W G プリマスサイクラーで P C R を実施する。オリゴ (d T) およびランダムプライマー c D N A 合成反応物からの均等量を合わせる。1 μ l の c D N A 混合物を、5 0 μ l P C R 反応で使用する (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第 2 版、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク (1 9 8 9))。

10

【 0 0 8 7 】

配列 G A _ 1 5 0 9 1 9 5 5 から設計された R A C E プライマーは、5-RACE: 5-ccc gct gct cag aag ggc act ccg ctg g-3 (配列番号 2 4) および 3-RACE: 5-tgg acc gtg ggc gcc ctg gag cga ggc-3 (配列番号 2 5) である。M W G バイオテックサイクラーで 3 5 サイクル (初回変性 9 5 で 3 秒間、9 5 で 3 0 秒間 (変性)、7 2 で 4 分間 (アニーリングおよび伸長)) 実行する。クロンテック M a r a t h o n R A C E キット説明書に記載されている実験手順を使用する。M a r a t h o n c D N A キットにより供給された A P 2 プライマーと一緒に使用される内側遺伝子特異的プライマーセット (5-RACE: 5'-ggg cc g ttc gag aca gaa aca gct gca g -3 (配列番号 2 7) および 3-RACE: 5-gct ggg act ac a tca tgg ttg ttg ctg -3 (配列番号 2 6) を用いて、2 回目の P C R 増幅工程を実行する。上記条件を用いて 3 0 P C R サイクルを実行する。R A C E クローンを、p C R I I - t o p o (インビトロゲン、グロニンゲン、オランダ国) へサブクローニングし、配列決定する。

20

30

【 0 0 8 8 】

R A C E クローンから得られた配列情報を用いて、対応するゲノム配列およびヒト C h r 1 7 q 1 1.1 における m G R R 2 遺伝子座を同定する (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human>)。転写配列を g e n s c a n プログラム (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) により予測し、推定読み枠を包含する P C R プライマーを設計する。プライマー対は、5'-CAC CGC CTC TGC CTG GGC TCT CCT G-3' (F1) (配列番号 28) および 5'-CGC TGC TCA GAA GGG CAC TCC GCT GG-3' (配列番号 29); 5'-GGA TTC CTG CTG CTT TAC TTT CC T GTC-3' (配列番号 30) および 5'-CCA CAG ACA CAC TTC AGC AAT GCC-3' (配列番号 31); 5'-CCA GGA AGG TGG AGA AGC CTG GGT GGG-3' (配列番号 32) および 5'-cta act tgc c ct gta gca ctc ctc-3' (r1) (配列番号 33) である。鑄型として 1 μ l の全ヒト脳 c D N A 混合物 (上記) を用いて、3 5 P C R サイクルを実行する: 初回変性 9 5 で 3 秒間、9 5 で 3 0 秒間 (変性)、6 2 ~ 6 8 で 3 0 秒間、7 2 で 8 分間。プロメガ (ヴァリセレン、スイス国) からの校正 P f u ポリメラーゼを使用する。上記と同様 (2 5 の P C R サイクルを実行する: 初回変性 9 5 で 3 秒間、9 5 で 3 0 秒間 (変性)、6 8 で 3 0 秒間、7 2 で 1 4 分間) P f u ポリメラーゼおよびプライマー F 1 および R 1 を用いる P C R 反応においてオーバーラップ伸長を通してスプライシングすることにより (Methods E n z y m o l. 1 9 9 3、2 1 7 : 2 7 0 - 2 7 9)、完全長配列を構築し、c D N A 配列を哺乳類発現ベクター (p c D N A 3.1 - zeo、インビトロゲン) へ挿入する。

40

50

【0089】

本発明の一ポリペプチド(mGRR2、対応するDNA配列、配列番号5)は、2367アミノ酸(配列番号6)のタンパク質についての読み枠を含む。推定シグナルペプチド配列(MGTRGAVMPPPMWGLLGCCFVCAWALG(配列番号34))が、mGRR2ポリペプチド(配列番号6)のN末端そのものに位置するということから、N末端タンパク質配列は細胞外に位置することが示唆される。hmGRR2のアミノ酸配列は、mGRRaと51%の同一性を示し、58%の類似残基を伴う(mGRR2の残基61~737を伴うmGRRaのアミノ酸残基81~770のbestfitアラインメント)。

【0090】

異なる脳領域に由来するcDNA(クロンテック)および上記RACEプライマーを用いたPCRによる発現プロファイリングは、mGRR1a/bに対するオーバーラップ発現プロファイルと共に脳におけるmGRR2 mRNAの広範な分布を示す。 10

【0091】

実施例3：部分的ラットmGRR1のクローニング

ラットmGRR1 cDNAクローンは、blastn検索における問い合わせとしてヒトmGRR1a配列(配列番号1)を用いることにより、整列させた後根ガングリオンcDNAライブラリー(ノヴァリティス起源)で同定される。このクローンからのプラスミドDNAを単離し、cDNA挿入体を部分的に配列決定する(配列番号16)。ヌクレオチド配列は、対応するヒトmGRR1およびb配列(配列番号1、配列番号3)と80%同一である。 20

【0092】

実施例4：哺乳類細胞発現(In situハイブリダイゼーション)

³²P-UTPセンスおよびアンチセンスリボプローブの合成用鋳型として、ラットmGRR cDNA(配列番号16)のフラグメントを、T7プロモーター配列が結合されたプライマーを用いるPCRにより増幅する。プライマー配列は、5-AAT GGA AGT CAG TTG TAC AC-3(配列番号17)および5-TTA tac act cac tat agg gaA ATG TCC CTT TAA CAG GCT G-3(配列番号18)(アンチセンス鋳型)および5-taa tac gac tca cta tag gga AAT GGA AGT CAG TTG TAC AC-3(配列番号19)および5-AAT GTC CCT TTA ACA GGC TG-3(配列番号20)(センス鋳型)である。50ngの鋳型プラスミド(ラットmGRR、配列番号16)を用いて、MWGプリマスサイクラーにおいて25のPCRサイクルを実行する。PCR 30
条件は、95 で30秒間(変性)、68 で1分間(アニーリング)および72 で1分間(伸長)である。予測サイズ(590bp)のPCR産物が得られ、これをスピнкаラム(ロシェ・ディアグノスティクス、インディアナポリス、米国、カタログ番号1732668)により精製し、³⁵S-標識RNAプローブの合成に使用する。

【0093】

プローブ合成を、RNA転写キット(ストラタジーン、ラジョラ、カリフォルニア、米国)により以下の要領で実施する。6μlの[³⁵S]UTPおよび6μlの[³⁵S]ATP(比活性1200Ci/mmol、NEN、ボストン、マサチューセッツ、米国)を、1.5ml管中で濃縮する。その後、2μlの5×転写緩衝液、1μlの100mMのDTT、3μlのDEPC-H₂O、1μlの溶液(10μlの100mMのCTP、1 40
0μlの100mMのGTP、30μlのDEPC-H₂O含有)、1μlのRNアシン、1μlのT7またはT3ポリメラーゼおよび200ngのPCR産物を加える。37で1~1.5時間のインキュベーション後、50μlのSDS20%、100μlの0.1MのDDTおよび850μlの10mMトリス-1mMのEDTA(pH7.4)を含む溶液90μlを加えることにより、反応を停止させる。セファデックスG-50スピнкаラム(ベーリンガー、マンハイム、ドイツ国)で精製後、シンチレーション計数法により放射能を測定する。ハイブリダイゼーション混合物を、2種の別々の溶液から調製する。すなわち、溶液Aは、10mlのホルムアミド、4mlの50%デキストランスルフェート、400μlの50×デンハート溶液(500mlのH₂O中、5gのフィコル、5gのポリビニルピロリドンおよび5gのウシ血清アルブミン)、40μlの0.5MのEDTA 50

(pH 8.0)、200 μ l の 1 M の トリス (pH 8.0) および 1.2 ml の 5 M の NaCl を含む。溶液 B は、1 ~ 5 μ l の 35 S 標識プローブ (正確な量は、最終培地中で 10^7 cpm/ml の濃度に達するように特定される)、100 μ l の tRNA、100 μ l の 0.1 M の DTT および最終的に 2 ml にするための適量の DEPC-H₂O を含み、これを 65 °C で 5 分間加熱する。最終ハイブリダイゼーション混合物を、十分に混合した 8 ml の溶液 A および 2 ml の溶液 B により調製し、注射器濾過し、5 分間 65 °C で再加熱し、5 分間 10000 g で遠心分離することにより、気泡を除去する。

【0094】

ラット脳を、-20 ~ -25 °C の低温保持装置で 8 ~ 16 μ m 厚さの冠状片に切断し、ゼラチン-ポリ-L-リシン-コーティングしたスライドに載せる。断片を室温で一晩真空乾燥し、4% (w/v) 氷冷パラホルムアルデヒド中で 5 分間固定し、1 x PBS 中で 1 分 3 回洗浄する。それらを同日ハイブリダイゼーションに使用するか、または -70 °C の密閉スライド箱中で貯蔵する。

10

【0095】

ハイブリダイゼーション当日、冷凍したスライド箱を室温に達するまで密閉したままにしておく。次いで、スライドを、250 ml の 0.3 M のトリエタノールアミンを含む染色皿に連続的に浸し、625 μ l の無水酢酸が加えられた同じエタノールアミンでアセチル化し、等級付けしたエタノール (50、70、95、100、100%) 中で脱水し、1 ~ 3 時間真空乾燥する。75 μ l のハイブリダイゼーション混合物をピペットでカバーガラスに移す。ガラススライドとの接触時、溶液は毛管現象により断片全体に均一に拡散する。一旦 DPX で密閉し、スライドを置き、16 ~ 20 時間 56 °C に保つ。次いで、スライドを室温で冷却し、硬化 DPX を除去し、カバーガラスがはずれるまでスライドを 20 分間またはそれ以上 4 x SSC 緩衝液に浸す。0.1 x SSC 中における高ストリンジェンシー洗浄を 68 °C で行う。エマルジョン-浸漬のため、断片を 95% エタノール中で 5 分、100% エタノール中で 5 分を 3 回、キシレン中で 5 分を 1 回、100% エタノール中で 30 秒を 1 回および再び 3 回 (前と同じ溶液) 脱脂し、少なくとも 1 時間真空乾燥する。次いで、暗室中で、液体核エマルジョン (コダック、NTB2、インテグラ・バイオサイエンス AG、ヴァリセレン、スイス、州/国) を、52 °C に予熱しておいた蒸留水中で 1:1 に希釈する。混合物を 52 °C の水浴中で 15 分間溶解させる。次いで、溶液を 180 °C 回転により非常に静かに攪拌し、十分ではあるが、発泡を回避しながら混合し、さらに 15 分間静置する。均一混合物を特製浸漬フラスコ中に注ぎ、再び 15 分間置いて泡を除く。次いで、スライドをエマルジョン中に 1 回浸漬し、3 時間暗いチャンパーに入れたホルダーで乾燥する。スライドを、暗室中 4 °C の密閉スライド箱で貯蔵する。16 ~ 60 d 暴露後、スライドを現像処理する。標準濃度で使用される現像液 D-19 および定着液 (コダック) を、氷中で 15 °C に冷却する。次いでスライドを現像液に 3.5 分間浸し、15 °C の水で 15 秒間洗浄し、6 分間定着させる。最後に、それらを脱塩水で 1 時間洗浄する。断片を対比染色するかまたは、カバーガラスを置く前にスライドを 3 滴の組織封入剤 (パーマウント、フィッシャー・サイエンティフィック、ピッツバーグ、ペンシルベニア、米国) と共に顕微鏡検査用に固定し、カバーガラスが強く接着するまで数日間スライド箱で乾燥する。

20

30

40

【0096】

mGRR mRNA の観察された脳特異領域分布は、mGRR リガンドについての可能な指標に関する情報を提供する。mGRR リガンドは、天然リガンドおよび mGRR 活性のモジュレーター、例えば抗 mGRR 抗体および / または mGRR 介在シグナル伝達を促進または打ち消す小分子である。ファミリー 3 GPCR、例えば代謝型グルタミン酸受容体および GABA-B 受容体は、シナプス伝達を調節し、イオンチャンネルと比べてそれらの効果は持続性があり、調節的である。mGRR の脳における mRNA 発現パターンは、mGRR 相互作用分子が、神経学および / または精神医学的疾患、例えば限定されるわけではないが、痴呆、精神分裂病、うつ病、情動障害、癲癇および運動障害の処置に有用であることの指標を提供する。

50

【 0 0 9 7 】

本発明ポリペプチドは、全主要脳構造で発現される(表1)。

【表2】

脳領域、核または細胞型	発現レベル	
主な嗅球		
系球体周辺細胞	+	
僧帽状細胞	+++	
顆粒細胞	+	
房飾細胞		10
内側	++	
外側	+++	
前脳基底部		
尾状核被殻	+++	
淡蒼球	0	
側座核	++	
嗅結節	++	
カエハ島	0	
腹側淡蒼球	++	20
扁桃核		
基底外側核	+	
前部		
後部		
基底内側核	++	
中心核, 外側	+	
内側核	+	
後腹側		
後背側		
外側核	+++	30
腹側正中/腹側外側		
側背		
後内側皮質扁桃核	++	
中隔野		
外側中隔	++	
内側中隔		
床核分界条		
海馬形成		
錐体細胞層 CA1	++	40
錐体細胞層 CA3	+++	
齒状回、顆粒層	++	
門細胞	++++	
他の非主要細胞	+++	
海馬台背側	+	
視床		
視床背側核		

【表3】

50

前群		
外側背側、腹外側 (LDVL)	++	
外側背側、背內側 (LDDM)	++	
背側群(IMD)	++	
外側群		
外側後內吻(LPMR)	++	
中群		
室旁核(PVP)	+	
內背側(MDM)、內側	+++	
內背側(MDC)、中心外側	+++	10
腹側群		
腹側內側核(VM)	+++	
腹側後側內側核(VPM)	+	
腹側後側外側核(VPL)	+	
後群		
結合核	+	
膝狀體群		
內側膝狀體核		
外側膝狀體核、背側	++	
外側膝狀體核、腹側	++	
視床上部		20
內側手網	++	
外側手網	++	
視床腹部		
不確帶	+	
視床毛樣體核	+	
視床下核		
視床下部		
內側視索前核	+	
腦室周圍核	+	
內側視索前野	+	30
外側視索前野	+	
前腹側視索前核	+	
前內側視索前核	+	
對角帶核	+	
大型細胞視索前核	+	
後室周圍核	+	
背內側視床下部 (DMD)	+	
腹內側視床下部		
背內側 (VMHDM)	+	
腹外側 (VMHVL)	+	
視索上核	+	40
乳頭體	++	
室旁視床下部核	+	
中腦/腦幹		
黑質		
緻密部	+++	
網樣部	0	
腹側被蓋野	++++	
腳間核	+	

【表 4】

中脳網様体核	++	
上丘		
浅灰白層	++	
視神経線維層	++	
下丘	++	
中脳水道周囲灰白質	+	
腹側蝸牛神経核	+	
青斑	+++	
背側縫線核	+	10
橋-延髄		
橋核	+++	
三叉神経中脳路核	+++	
中心灰白橋	++	
傍小脳脚核	+++	
外側上オリーブ	+++	
オリーブ	+++	
中脳前庭神経核	++	
孤束核	++	
皮質		20
前頭		
層 I	+	
層 II-III	++	
層 V	+++	
層 VI	+	
壁側板		
層 I	+	
層 II-III	++	
層 IV	++++	
層 V	+++	
層 Via	+	30
層 Vib	++	
梨状皮質	+++	
脳梁灰白層	+++	
小脳		
分子層	+	
顆粒層	++	
プルキンエ細胞	0	
ゴルジ細胞	++++	
深部小脳核(外側)	+	40
白質域(グリア細胞)		
前交連	0	
脳弓	0	
外側嗅索	0	
脳梁	0	

【0098】

表1：ラット脳全体にわたるmGRR1をコードするmRNAの分布。使用されるハイブリダイゼーションプローブは、mGRR1aおよびmGRR1bに共通したC-末端配列に対応する(パンプローブ)。10日間核エマルジョンに暴露した後、暗視野顕微鏡下で発

現レベルを冠状および矢状方向脳断片について評価した。0 = 検出可能な発現は無し、+ = 弱い、++ = 中ぐらい、+++ = 高い、++++ = 非常に高い。

【0099】

mGRR mRNAの観察された脳特異領域分布は、mGRRリガンドについての可能な指標に関する情報を提供する。mGRRリガンドは、天然リガンドおよびmGRR活性のモジュレーター、例えば抗mGRR抗体および/またはmGRR介在シグナル伝達を促進または打ち消す小分子である。ファミリー3 GPCR、例えば代謝型グルタミン酸受容体およびGABA-B受容体は、シナプス伝達を調節し、イオンチャンネルと比べてそれらの効果は持続性があり、調節的である。

【0100】

実施例5：免疫プロット

HA標識mGRR1aの生成。C-末端血球凝集素(HA)エピトープ(ヌクレオチド配列5'-TATCCATATGATGTTCCAGATTATGCT(配列番号21))を、mGRR1aのC-末端配列に付加した。この末端に対し、鋳型として(50ng)pcDNA3.1topoにおけるヒトmGRR1aを用いてプライマー5'-CAAGACTCCAGTTCTCCAGAG(配列番号22)および5'-TCTAGATCTAGACTAAGCATAATCTGGAACATCATATGGATACACTTTAAACTATCCAGATC(配列番号23)によりPCR反応を実行した。95(30秒)、68(30秒)、72(30秒)で25のPCRサイクルを実行した。予想サイズ(417bp)のPCR産物が得られ、これをBsgIおよびXbaIで二重消化し、ゲル精製(Qiaex、キアゲン)し、pcDNA3topoにおける野生型hmGRR1aのBsgI/XbaIフラグメントの置換に用いた。両鎖の配列決定により構築物を確認した。

【0101】

免疫プロット。トランスフェクションされたCOS1細胞からの膜を解凍し、遠心分離にかけ、HEPES緩衝液pH(125mMのNaCl、5mMのKCl、0.6mMのMgCl₂、1.8mMのCaCl₂、20mMのHEPES、6mMのデキストロース；(ライフ・テクノロジー#043-90174M))、50μg/mlのデオキシリボヌクレアーゼIに再懸濁し、試料緩衝液(125mMのトリスpH6.8、1%SDS、25mMのDTT、5%のグリセリン/プロムフェノールブルー)中で希釈した。タンパク質(1レーン当たり20μg)を、4~15%勾配ゲルを用いるSDS-PAGEにより分離し、電気泳動によりイモビロン-P PVDFメンブラン(ミリポアAG、フォルケツビル、スイス国)へ移動させた。NET-G緩衝液(150mMのNaCl、50mMのトリス-C1 pH7.4、5mMのEDTA、0.05%(v/v)のトリトンX100、0.25%w/vのゼラチン)中で一晩インキュベーションすることにより非特異的結合を減少させた。それに続いて、膜を、室温で45分間NET-G中(1:500)においてモノクローナルラット抗HA-ペルオキシダーゼ高アフィニティー抗体(3F10、ロシエカタログ番号2013819)とインキュベーションした。NET-Gにより3回洗浄(各10分)後、強化化学発光ウエスタンプロット試薬(アマーシャム・ライフ・サイエンス#2106)を用いて結合抗体を検出し、膜をバイオマックスMR(コダック)フィルムに露出した。pcDNA3.1-topo(ギブコ・ライフ・サイエンス)におけるヒトGRR-HAでトランスフェクション後のCOS-1細胞からの膜のウエスタンプロットは、134kDa(そのタンパク質配列から予測された通り)のところにタンパク質バンドを示す。免疫プロットは、細胞膜により為されているためmGRRが細胞膜で見出されることを示す。

【0102】

実施例6：機能分析

mGRR1a、mGRR1bおよびmGRR2は、推定相互作用受容体タンパク質と一緒に組換え発現系、例えばHEK293細胞またはCOS細胞において共発現され得る。cDNA発現構築物のコトランスフェクションは、例えばエフェクテントランスフェクション剤(キアゲン)により行われ得る。機能的リードアウトは、アゴニスト誘導GTPγS結合、例えばGalvez et al., Mol.Pharmacol., 57, 419-426(2000)またはカ

10

20

30

40

50

リウムチャンネルの活性化(Lingenhoehl et al., Neuropharmacology, 38, 1667-1673(1999))の分析を含み得る。Gタンパク質またはキメラGタンパク質のコトランスフェクションを用いることにより、報告された要領(Galvez et al., EMBO J, 20, 2152-2159(2001))で測定され得るカルシウムシグナル(イノシトールリン酸蓄積)を発生させ得る。別法として、放射性標識候補リガンドの結合は、トランスフェクション細胞から誘導された膜調製物を用いて測定され得る。さらに、以下の実験により、mGRR1およびmGRR2の機能が解明され得る。

【0103】

a) 遺伝子ノックアウト

ネズミmGRR1およびmGRR2遺伝子は、それぞれ近位Chr2および遠位Chr11に局在している。ネズミmGRR遺伝子およびそれらの構造についての知識を用いて、mGRRaおよび/またはmGRR2遺伝子の機能が除去されたマウスを製造する目的で遺伝子ターゲティング構築物を設計する。ノックアウト動物は、構成的または誘導性ノックアウトを含めて報告された(Neuron, 2001: 31, 47-58)標準的方法により製造される。同型接合ノックアウトマウスの表現型を生化学、薬理学および電気生理学的範例で研究することにより、既知生化学的および受容体経路が被り得る損傷を試験する。また上記動物は、様々な行動的範例でも研究されている(Neuron, 2001; 31, 47-58)。

【0104】

CG11923により、哺乳類mGRRの推定ショウジョウバエ(Drosophila)相同体が同定された。CG11923の機能がPエレメント突然変異導入手段により破壊されたショウジョウバエの表現型が研究されている。結果は、インビボでのmGRR1およびmGRR2の機能の解明に役立つものであると予測される。

【0105】

b) 相互作用タンパク質

ベイト(おとり)としてCまたはN末端配列を用いることにより、mGRR1およびmGRR2の相互作用タンパク質が同定される。これは、脳cDNAライブラリーの酵母2ハイブリッドスクリーンおよびGST融合タンパク質の生成を伴うもので、後続の脳抽出物を用いたブルダウン解析法およびタンパク質の質量分光法に使用される。また上述の方法を使用することにより、mGRR1およびmGRR2についての可能なヘテロ二量体相互作用を調べる。潜在的相互作用タンパク質を、トランスフェクション細胞およびニューロン培養物における共局在性実験で調べる。ヒトmGRR1a/bのC末端そのものにおいて、推定II型PDZタンパク質結合モチーフ(J Biol Chem, 2002, 277, 15221-4)が同定されることから、mGRR1a/bと既知PDZモチーフ結合タンパク質、例えばPICK1との相互作用は、mGRRを既知GPCRシグナル伝達経路に指向させ得ることが示唆される(EMBO J, 2002, 21, 2990-9)。PICK1とヒトmGRR1の推定相互作用を、上記共局在性および共免疫沈降試験を用いて調べる。

【0106】

c) リガンド・フィッシングスクリーン

推定GPCRリガンドのコレクションは、研究室において確立されている。推定受容体リガンドのバンクがスクリーニング用に構築された。バンクは、伝達物質、ホルモンおよびケモカイン、ヒト受容体についての推定アゴニストであり得る天然化合物、哺乳類対応物質がまだ同定されていない非哺乳類生物活性ペプチド、および天然では見出されないが、未知天然リガンドを伴う受容体を活性化する化合物を含む。このバンクは、機能性(すなわち、カルシウム、cAMP、マイクロフィジオメーター、卵母細胞電気生理現象など、下記参照)および結合検定法の両方を用いて既知リガンドについての受容体を最初にスクリーニングするのに使用される。mGRR1およびmGRR2を、組換え発現系、例えばHEK293細胞またはCOS細胞で推定相互作用受容体タンパク質(上記)と共発現させる。これはまた、mGRR1およびmGRR2の発現を含み得る。cDNA発現構築物のコトランスフェクションは、例えばエフェクテントランスフェクション剤(キアゲン)によ

り行なわれる。機能的リードアウトは、アゴニスト誘導 G T P γ S 結合、例えば Galvez et al., Mol. Pharmacol., 57, 419 - 426 (2000) またはカリウムチャンネルの活性化 (Lingenhoehl et al., Neuropharmacology, 38, 1667 - 1673 (1999)) の分析を含み得る。Gタンパク質またはキメラGタンパク質のコトランスフェクションを用いることにより、報告された要領 (Galvez et al., EMBO J, 20, 2152 - 2159 (2001)) で測定されるカルシウムシグナル (イノシトールリン酸蓄積) を発生させ得る。別法として、放射性標識候補リガンドの結合を、トランスフェクション細胞から誘導された膜調製物を用いて測定する。

【0107】

d) 抽出物 / 細胞上清スクリーニング

現在までのところ、同族活性化リガンド (アゴニスト) が存しないままの多数の哺乳類受容体が存在する。すなわち、これらの受容体についての活性リガンドは、現在までに同定されたりガンドバンク内には含まれ得ない。

【0108】

したがって、また本発明受容体を、組織抽出物に対する機能性スクリーニング (カルシウム、cAMP、マイクロフィジオメーター、卵母細胞電気生理現象など、機能性スクリーニング) にかけることにより、天然リガンドが同定される。正の機能性応答を生じる抽出物は、活性化リガンドが単離同定されるまで連続的にサブフラクション化され得る。

【0109】

e) 抗体およびペプチド

抗体 (ポリクローナルまたはモノクローナル) は、mGRR の N および C 末端エピトープに対して産生される。同定された推定相互作用タンパク質 (例えば上記 P I C K 1) と mGRR タンパク質の会合を破壊することが予測されるペプチドを設計する。内在的に発現された mGRR タンパク質の機能を破壊する目的で抗体および / ペプチドを培養ニューロン細胞に適用する。抗体および / またはペプチド処理細胞の電気生理学的特性を未処理細胞と比較研究する。

【0110】

実施例 7 : リガンド結合検定法

リガンド結合検定法は、受容体薬理学についての直接確認方法を提供するもので、高スループットフォーマットに適用可能である。結合試験用に、受容体についての精製リガンドを、高比活性 (50 ~ 2000 Ci / mmol) に放射性標識する。次いで、放射性標識方法がその受容体に向かうリガンドの活性を減じることではないという測定がなされる。緩衝液、イオン、pH および他のモジュレーター、例えばヌクレオチドについての検定条件を最適化することにより、膜および全細胞受容体供給源の両方にとって実行可能なシグナル対ノイズ比を確立する。これらの検定法については、放射能合計 - 過剰の非標識競合リガンドの存在下で測定された放射能として、特異的受容体結合を定義する。可能な場合、複数の競合リガンドを用いて、残留非特異的結合を特定する。

【0111】

mGRR 1 a、mGRR 1 b および mGRR 2 は、本質的に同じリガンドを有し得る。

【0112】

実施例 8 : 染色体局在性

慣用技術を用い、公開ドメインデータベース、例えば E N S E M B L (<http://www.ensembl.org/>) を用いて染色体局在性を推測する。ヒト Chr 10 p 11.2 - p 12 におけるヒト mGRR 地図、ヒト Chr 17 q 11.1 における mGRR 2 遺伝子座地図。

10

20

30

40

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/018798 A2

- (51) International Patent Classification: C12N 15/10, 15/12, 15/63, C07K 14/705, 16/28, G01N 33/68
- (74) Agent: GROS, Florent; Novartis AG, Corporate Intellectual Property, Patent & Trademark Department, CH-4002 Basel (CH).
- (21) International Application Number: PCT/EP02/09518
- (81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LI, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) International Filing Date: 26 August 2002 (26.08.2002)
- (84) Designated States (regional): Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SI, SK, TR).
- (25) Filing Language: English
- (30) Priority Data: 60/315,111 27 August 2001 (27.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except AT, US): NOVARTIS AG [CH/CH]; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).
- (71) Applicant (for AT only): NOVARTIS-ERFINDUNGEN VERWALTUNGSGESELLSCHAFT M.B.H. [A1/A1]; Brunner Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): KAUPMANN, Klemens [DE/DE]; Binzenerstrasse 7D, 79539 Loerrach (DE).
- Published: — without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/018798 A2

(54) Title: NOVEL G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR AND DNA SEQUENCES THEREOF

(57) Abstract: This invention relates to newly identified polypeptides and polynucleotides encoding such polypeptides, to their use in diagnosis and in identifying compounds that may be agonists, antagonists that are potentially useful in therapy, and to production of such polypeptides and polynucleotides, belonging to the class of G-protein coupled receptors.

Novel G-protein coupled receptor and DNA Sequences Thereof**Field of the Invention**

This invention relates to newly identified polypeptides and polynucleotides encoding such polypeptides, to their use in diagnosis and in identifying compounds that may be agonists or antagonists that are potentially useful in therapy, and to production of such polypeptides and polynucleotides, sharing similarity to G-protein coupled receptors (GPCR).

Background of the Invention

The drug discovery process is currently undergoing a fundamental revolution as it embraces "functional genomics", that is, high throughput genome- or gene-based biology. This approach as a means to identify genes and gene products as therapeutic targets is rapidly superseding earlier approaches based on "positional cloning". A phenotype, that is a biological function or genetic disease, would be identified and this would then be tracked back to the responsible gene, based on its genetic map position.

Functional genomics relies heavily on high-throughput DNA sequencing technologies and the various tools of bioinformatics to identify gene sequences of potential interest from the many molecular biology databases now available. There is a continuing need to identify and characterise further genes and their related polypeptides/proteins, as targets for drug discovery.

Summary of the Invention

The present invention relates to purified metabotropic glutamate receptor-related membrane receptor proteins of human origin referred to herein as human mGRR1a, mGRR1b and mGRR2 (all three are herein referred to as mGRR). The similarity of mGRR to metabotropic glutamate receptors suggests that these receptors also belong to family 3 of the GPCR. This receptor family comprises metabotropic glutamate receptors, GABA-B receptors, the Ca-sensing receptor, putative taste receptors and a family of olfactory vomeronasal receptors. The closest mammalian GPCR homologue found to the polypeptides of the invention in public domain databases is the metabotropic glutamate receptor type 3 (accession Q11923) with 23% identical and 43% similar amino acid residues to the polypeptide of mGRR1a described in SEQ ID NO: 2. Such polypeptides and polynucleotides are of interest in relation to methods of treatment of certain diseases,

including, but not limited to the treatment of disorders associated with the central and peripheral nervous systems. In particular, mGRR receptor agonists or antagonists can e.g. be useful in treating neurological and/ or psychiatric diseases, including but not limited to dementia, schizophrenia, depression, affective disorders, epilepsy, and motoric disorders, hereinafter referred to as "diseases of the invention". In a further aspect, the invention relates to methods for identifying agonists and antagonists to mGRR (e.g., inhibitors) using the materials provided by the invention, and treating conditions associated with imbalance of such identified compounds. In still a further aspect, the invention relates to diagnostic assays for detecting diseases associated with inappropriate mGRR activity or levels.

Description of the Invention

Glossary

The following definitions are provided to facilitate understanding of certain terms used herein.

"Isolated" means altered from its natural state, i.e. if it occurs in nature, it has been changed or removed from its original environment, or both. For example, a polynucleotide or a polypeptide naturally present in a living organism is not "isolated," but the same polynucleotide or polypeptide separated from the coexisting materials of its natural state is "isolated", as the term is employed herein. Moreover, a polynucleotide or polypeptide that is introduced into an organism by transformation, genetic manipulation or by any other recombinant method is "isolated" even if it is still present in said organism, which organism may be living or non-living.

"Polynucleotide" generally refers to any polyribonucleotide (RNA) or polydeoxiribonucleotide (DNA), which may be unmodified or modified RNA or DNA.

"Polynucleotides" include, without limitation, single- and double-stranded DNA, DNA that is a mixture of single- and double- stranded regions, single- and double-stranded RNA, and RNA that is mixture of single- and double-stranded regions, hybrid molecules comprising DNA and RNA that may be single-stranded or, more typically, double-stranded or a mixture of single- and double-stranded regions. In addition, "polynucleotide" refers to triple-stranded regions comprising RNA or DNA or both RNA and DNA. The term "polynucleotide" also includes DNAs or RNAs containing one or more modified bases and DNAs or RNAs with backbones modified for stability or for other reasons.

"**Modified**" bases include, for example, tritylated bases and unusual bases such as inosine. A variety of modifications may be made to DNA and RNA; thus, "polynucleotide" embraces chemically, enzymatically or metabolically modified forms of polynucleotides as typically found in nature, as well as the chemical forms of DNA and RNA characteristic of viruses and cells. "Polynucleotide" also embraces relatively short polynucleotides, often referred to as oligonucleotides.

"**Polypeptide**" refers to any polypeptide comprising two or more amino acids joined to each other by peptide bonds or modified peptide bonds, i.e., peptide isosteres. "Polypeptide" refers to both short chains, commonly referred to as peptides, oligopeptides or oligomers, and to longer chains, generally referred to as proteins. Polypeptides may contain amino acids other than the 20 gene-encoded amino acids. "Polypeptides" include amino acid sequences modified either by natural processes, such as post-translational processing, or by chemical modification techniques that are well known in the art. Such modifications are well described in basic texts and in more detailed monographs, as well as in a voluminous research literature familiar to one of skill in the art. Modifications may occur anywhere in a polypeptide, including the peptide backbone, the amino acid side-chains and the amino or carboxyl termini. It will be appreciated that the same type of modification may be present to the same or varying degrees at several sites in a given polypeptide. Also, a given polypeptide may contain many types of modifications. Polypeptides may be branched as a result of ubiquitination, and they may be cyclic, with or without branching. Cyclic, branched and branched cyclic polypeptides may result from post-translation natural processes or may be made by synthetic methods. Modifications include acetylation, acylation, ADP-ribosylation, amidation, biotinylation, covalent attachment of flavin, covalent attachment of a heme moiety, covalent attachment of a nucleotide or nucleotide derivative, covalent attachment of a lipid or lipid derivative, covalent attachment of phosphatidylinositol, cross-linking, cyclization, disulfide bond formation, demethylation, formation of covalent cross-links, formation of cystine, formation of pyroglutamate, formylation, gamma-carboxylation, glycosylation, GPI anchor formation, hydroxylation, iodination, methylation, myristoylation, oxidation, proteolytic processing, phosphorylation, prenylation, racernization, selenoylation, sulfation, transfer-RNA mediated addition of amino acids to proteins such as arginylation, and ubiquitination (see, for instance, *Proteins - Structure and Molecular Properties*, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., *Post-translational Protein Modifications: Perspectives and Prospects*, 1-12, in *Post-translational Covalent Modification of Proteins*, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, 1983;

Seifter et al., "Analysis for protein modifications and nonprotein cofactors", *Meth Enzymol*, 182, 626-646, 1990, and Rattan et al., "Protein Synthesis: Post-translational Modifications and Aging", *Ann NY Acad Sci*, 663, 48-62, 1992).

"Fragment" of a polypeptide sequence refers to a polypeptide sequence that is shorter than the reference sequence but that retains essentially the same biological function or activity as the reference polypeptide. "Fragment" of a polynucleotide sequence refers to a polynucleotide sequence that is shorter than the reference sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4.

"mGRR" refers to the two splice variants human mGRR1a and mGRR1b and human mGRR2. The N-terminal sequence of mGRR1b (amino acid 1 to 53) does not share significant sequence similarity to the N-terminal sequence of mGRR1a (amino acid 1 to 82). The human mGRR2 amino acid sequence has 59% identity to human mGRR1a (bestfit alignment residues 61-733 of mGRR2 with 81-765 of mGRR1a).

"Variant" refers to a polynucleotide or polypeptide that differs from a reference polynucleotide or polypeptide, but retains the essential properties thereof. A typical variant of a polynucleotide differs in nucleotide sequence from the reference polynucleotide. Changes in the nucleotide sequence of the variant may or may not alter the amino acid sequence of a polypeptide encoded by the reference polynucleotide. Nucleotide changes may result in amino acid substitutions, additions, deletions, fusions and truncations in the polypeptide encoded by the reference sequence, as discussed below. A typical variant of a polypeptide differs in amino acid sequence from the reference polypeptide. Generally, alterations are limited so that the sequences of the reference polypeptide and the variant are closely similar overall and, in many regions, identical. A variant and reference polypeptide may differ in amino acid sequence by one or more substitutions, insertions, deletions in any combination. A substituted or inserted amino acid residue may or may not be one encoded by the genetic code. Typical conservative substitutions include Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln-I Ser, Thr; Lys, Arg; and Phe and Tyr. A variant of a polynucleotide or polypeptide may be naturally occurring such as an allele, or it may be a variant that is not known to occur naturally. Non-naturally occurring variants of polynucleotides and polypeptides may be made by mutagenesis techniques or by direct synthesis. Also included as variants are polypeptides having one or more post-translational modifications, for instance glycosylation, phosphorylation, methylation, ADIP ribosylation and the like. Embodiments include methylation of the N-terminal amino acid, phosphorylations of serines and threonines and modification of C-terminal glycines.

"Polymorphism" refers to a variation in nucleotide sequence (and encoded polypeptide sequence, if relevant) at a given position in the genome within a population.

"Single Nucleotide Polymorphism" (SNP) refers to the occurrence of nucleotide variability at a single nucleotide position in the genome, within a population. An SNP may occur within a gene or within intergenic regions of the genome. SNPs can be assayed using Allele Specific Amplification (ASA). For the process at least 3 primers are required. A common primer is used in reverse complement to the polymorphism being assayed. This common primer can be between 50 and 1500 bps from the polymorphic base. The other two (or more) primers are identical to each other except that the final 3' base wobbles to match one of the two (or more) alleles that make up the polymorphism. Two (or more) PCR reactions are then conducted on sample DNA, each using the common primer and one of the Allele Specific Primers.

"Splice Variant" as used herein refers to cDNA molecules produced from RNA molecules initially transcribed from the same genomic DNA sequence but which have undergone alternative RNA splicing. Alternative RNA splicing occurs when a primary RNA transcript undergoes splicing, generally for the removal of introns, which results in the production of more than one mRNA molecule each of that may encode different amino acid sequences. The term splice variant also refers to the proteins encoded by the above cDNA molecules.

"Identity" reflects a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, determined by comparing the sequences. In general, identity refers to an exact nucleotide to nucleotide or amino acid to amino acid correspondence of the two polynucleotide or two polypeptide sequences, respectively, over the length of the sequences being compared.

"% Identity" - For sequences where there is not an exact correspondence, a "% identity" may be determined. In general, the two sequences to be compared are aligned to give a maximum correlation between the sequences. This may include inserting "gaps" in either one or both sequences, to enhance the degree of alignment. A % identity may be determined over the whole length of each of the sequences being compared (so-called global alignment), that is particularly suitable for sequences of the same or very similar length, or over shorter, defined lengths (so-called local alignment), that is more suitable for sequences of unequal length.

"Similarity" is a further, more sophisticated measure of the relationship between two polypeptide sequences. In general, "similarity" means a comparison between the amino

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 6 -

acids of two polypeptide chains, on a residue by residue basis, taking into account not only exact correspondences between a between pairs of residues, one from each of the sequences being compared (as for identity) but also, where there is not an exact correspondence, whether, on an evolutionary basis, one residue is a likely substitute for the other. This likelihood has an associated "score" from which the "% similarity" of the two sequences can then be determined.

Methods for comparing the identity and similarity of two or more sequences are well known in the art. Thus for instance, programs available in the Wisconsin Sequence Analysis Package, version 9.1 (Devereux J et al, *Nucleic Acids Res*, 12, 387-395, 1984, available from Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin, USA), for example the programs BESTFIT and GAP, may be used to determine the % identity between two polynucleotides and the % identity and the % similarity between two polypeptide sequences. BESTFIT uses the "local homology" algorithm of Smith and Waterman (*J Mol Biol*, 147,195-197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482-489, 1981) and finds the best single region of similarity between two sequences. BESTFIT is more suited to comparing two polynucleotide or two polypeptide sequences that are dissimilar in length, the program assuming that the shorter sequence represents a portion of the longer. In comparison, GAP aligns two sequences, finding a "maximum similarity", according to the algorithm of Needleman and Wunsch (*J Mol Biol*, 48, 443-453, 1970). GAP is more suited to comparing sequences that are approximately the same length and an alignment is expected over the entire length. Preferably, the parameters "Gap Weight" and "Length Weight" used in each program are 50 and 3, for polynucleotide sequences and 12 and 4 for polypeptide sequences, respectively. Preferably, % identities and similarities are determined when the two sequences being compared are optimally aligned.

Other programs for determining identity and/or similarity between sequences are also known in the art, for instance the BLAST family of programs (Altschul S F et al, *J Mol Biol*, 215, 403-410, 1990, Altschul S F et al, *Nucleic Acids Res.*, 25:389-3402, 1997, available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, Maryland, USA and accessible through the home page of the NCBI at www.ncbi.nlm.nih.gov) and FASTA (Pearson W R, *Methods in Enzymology*, 183, 63-99, 1990; Pearson W R and Lipman D J, *Proc Nat Acad Sci USA*, 85, 2444-2448,1988, available as part of the Wisconsin Sequence Analysis Package).

Preferably, the BLOSUM62 amino acid substitution matrix (Henikoff S and Henikoff J G, *Proc. Nat. Acad Sci. USA*, 89, 10915-10919, 1992) is used in polypeptide sequence

comparisons including where nucleotide sequences are first translated into amino acid sequences before comparison.

Preferably, the program BESTFIT is used to determine the % identity of a query polynucleotide or a polypeptide sequence with respect to a reference polynucleotide or a polypeptide sequence, the query and the reference sequence being optimally aligned and the parameters of the program set at the default value, as hereinbefore described.

"Identity Index" is a measure of sequence relatedness which may be used to compare a candidate sequence (polynucleotide or polypeptide) and a reference sequence. Thus, for instance, a candidate polynucleotide sequence having, for example, an Identity Index of 0.95 compared to a reference polynucleotide sequence is identical to the reference sequence except that the candidate polynucleotide sequence may include on average up to five differences per each 100 nucleotides of the reference sequence. Such differences are selected from the group consisting of at least one nucleotide deletion, substitution, including transition and transversion, or insertion. These differences may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference polynucleotide sequence or anywhere between these terminal positions, interspersed either individually among the nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. In other words, to obtain a polynucleotide sequence having an Identity Index of 0.95 compared to a reference polynucleotide sequence, an average of up to 5 - 25 in every 100 of the nucleotides of the in the reference sequence may be deleted, substituted or inserted, or any combination thereof, as hereinbefore described. The same applies mutatis mutandis for other values of the Identity Index, for instance 0.96, 0.97, 0.98 and 0.99.

Similarly, for a polypeptide, a candidate polypeptide sequence having, for example, an Identity Index of 0.95 compared to a reference polypeptide sequence is identical to the reference sequence except that the polypeptide sequence may include an average of up to five differences per each 100 amino acids of the reference sequence. Such differences are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion. These differences may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between these terminal positions, interspersed either individually among the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. In other words, to obtain a polypeptide sequence having an Identity Index of 0.95 compared to a reference polypeptide sequence, an average of up to 5

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 8 -

in every 100 of the amino acids in the reference sequence may be deleted, substituted or inserted, or any combination thereof, as hereinbefore described. The same applies mutatis mutandis for other values of the Identity Index, for instance 0.96, 0.97, 0.98 and 0.99. The relationship between the number of nucleotide or amino acid differences and the Identity Index may be expressed in the following equation:

$$n_a \leq x_a - (x_a \cdot I)$$

in which:

n_a is the number of nucleotide or amino acid differences,

x_a is the total number of nucleotides or amino acids in SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO: 2 for mGRR1a, respectively SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 5 for mGRR1b

I is the Identity Index,

\cdot is the symbol for the multiplication operator, and in which any non-integer product of x_a and I is rounded down to the nearest integer prior to subtracting it from x_a .

"**Homolog**" is a generic term used in the art to indicate a polynucleotide or polypeptide sequence possessing a high degree of sequence relatedness to a reference sequence. Such relatedness may be quantified by determining the degree of identity and/or similarity between the two sequences as hereinbefore defined. Falling within this generic term are the terms "ortholog", and "paralog". "Ortholog" refers to a polynucleotide or polypeptide that is the functional equivalent of the polynucleotide or polypeptide in another species. "Paralog" refers to a polynucleotide or polypeptide that within the same species which is functionally similar.

"**Fusion protein**" refers to a protein encoded by two, unrelated, fused genes or fragments thereof. Examples have been disclosed in US 5541087, 5726044. In the case of Fc-mGRR, employing an immunoglobulin Fc region as a part of a fusion protein is advantageous for performing the functional expression of Fc- mGRR or fragments of mGRR, to improve pharmacokinetic properties of such a fusion protein when used for therapy and to generate a dimeric Fc- mGRR. The Fc- mGRR DNA construct may comprise in 5' to 3' direction, a secretion cassette, i.e. a signal sequence that triggers export from a mammalian cell, DNA encoding an immunoglobulin Fc region fragment, as a fusion partner, and a DNA encoding Fc- mGRR or fragments thereof. In some uses it would be desirable to be able to alter the intrinsic functional properties (complement binding, Fc-Receptor binding) by mutating the functional Fc sides while leaving the rest of the fusion protein untouched or delete the Fc part completely after expression.

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 9 -

In a first aspect, the present invention provides mGRR polypeptides.

Such polypeptides comprise:

- (a) an isolated mGRR polypeptide encoded by a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 4;
- (b) an isolated mGRR polypeptide comprising a polypeptide sequence having at least 80%, 90%, 95%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 and which shows properties in the ligand binding assay similar to those of mGRR;
- (c) an isolated mGRR1a or mGRR1b polypeptide comprising the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
- (d) an isolated mGRR polypeptide having at least 80%, 90%, 95%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 and which shows properties in the ligand binding assay similar to those of mGRR;
- (e) the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5;
- (f) an isolated mGRR polypeptide having or comprising a polypeptide sequence that has an Identity Index of 0.80, 0.90, 0.95, 0.98, or 0.99 compared to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 5 and which shows properties in the ligand binding assay similar to those of mGRR; or
- (g) a fragment or variant of such a polypeptide according to (a) to (f).

Similar properties in the ligand binding assay means that under the same conditions for buffers, ions, pH and other modulators such as nucleotides, the detectable signal to noise ratio is in the range of +/- 30% of the signal of the mGRR polypeptide.

Polypeptides of the present invention are members of the G protein-coupled receptors family of polypeptides. The observed brain specific regional distribution of mGRR1 mRNA (Table 1) provides information on indications for mGRR ligands. mGRR ligands include the natural ligand as well as modulators of mGRR activity, such as anti-mGRR antibodies and/or small molecules that agonize or antagonize mGRR-mediated signalling. The brain specific regional distribution of mGRR mRNA indicates the importance of mGRRs in the regulation of normal brain function. Thus, abnormalities in the expression, abundance or activity of these polypeptides could lead to a wide variety of neurological and and/or psychiatric diseases, including, but not limited to, dementia, schizophrenia, depression, affective disorders, epilepsy, and motoric disorders. For example, in Alzheimer's disease and other dementias such as Age Associated Memory Impairment and Multi Infarct

Dementia, loss of cognitive function is associated with reduced levels of a number of neurotransmitters in the brain. Family 3 GPCR such as metabotropic glutamate receptors and GABA-B receptors also modulate synaptic transmission and in comparison to ion channel modulators their effects are rather long-lasting and modulatory. All these indications are hereinafter referred to as "biological activity" of mGRR1a, mGRR1b or mGRR2. Preferably, a polypeptide of the present invention exhibits at least one biological activity characteristic of mGRR1a, mGRR1b or mGRR2.

Polypeptides of the present invention also include variants of the aforementioned polypeptides, including all allelic forms and splice variants. Such polypeptides vary from the reference polypeptide by insertions, deletions, and substitutions that may be conservative or non-conservative, or any combination thereof.

Preferred fragments of polypeptides of the present invention include an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous amino acids from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6, or an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous amino acids truncated or deleted from the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6. Preferred fragments are biologically active fragments that mediate the biological activity of mGRR, including those with a similar activity or an improved activity, or with a decreased undesirable activity. Also preferred are those fragments that are antigenic or immunogenic in an animal, especially in a human.

Fragments or variants of the human polypeptides of , SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6 of the invention may be employed for producing the corresponding full-length polypeptide by using the rat or human DNA sequence (either SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 16) in low stringency hybridization to isolate the full length rat cDNA. This cDNA allows the generation of mGRR polypeptides using mammalian expression systems (see example 2). Stringency of hybridisation refers to conditions under which polynucleic acids hybrids are stable. Such conditions are evident to those of ordinary skill in the field. As known to those skilled in the art, the stability of hybrids is reflected in the melting temperature (T_m) of the hybrid which decreases approximately by 1 to 1.5°C with every 1% decrease in sequence homology. In general, the stability of a hybrid is a function of sodium ion concentration and temperature. Typically, the hybridisation reaction is performed under

conditions of higher stringency, followed by washes of varying stringency. As used herein, high stringency refers to conditions that permit hybridisation of only those nucleic acid sequences that form stable hybrids in 1 M Na⁺ at 65-68 °C. High stringency conditions can be provided, for example, by hybridisation in an aqueous solution containing 6x SSC, 5x Denhardt's, 1 % SDS (sodium dodecyl sulphate), 0.1 sodium pyrophosphate and 0.1 mg/ml denatured salmon sperm DNA as non specific competitor. Following hybridisation, high stringency washing may be done in several steps, with a final wash (about 30 min) at the hybridisation temperature in 0.2 - 0.1x SSC, 0.1 % SDS. Moderate stringency refers to conditions equivalent to hybridisation in the above described solution but at about 60-62°C. In that case the final wash is performed at the hybridisation temperature in 1x SSC, 0.1 % SDS. Low stringency refers to conditions equivalent to hybridisation in the above described solution at about 50-52°C. In that case, the final wash is performed at the hybridisation temperature in 2x SSC, 0.1 % SDS. It is understood that these conditions may be adapted and duplicated using a variety of buffers, e.g. formamide-based buffers, and temperatures. Denhardt's solution and SSC are well known to those of skill in the art as are other suitable hybridisation buffers (see, e.g. Sambrook, *et al.*, eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York or Ausubel, *et al.*, eds. (1990) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc.). In particular, the skilled person will understand that the stringency of hybridisation conditions may be varied by altering a number of parameters, primarily the salt concentration and the temperature, and that the conditions obtained are a result of the combined effect of all such parameters. Optimal hybridisation conditions have to be determined empirically, as the length and the GC content of the probe also play a role.

The polypeptides of the present invention may be in the form of the "mature" protein or may be a part of a larger protein such as a precursor or a fusion protein. It is often advantageous to include an additional amino acid sequence that contains secretory or leader sequences, pro-sequences, sequences that aid in purification, for instance multiple histidine residues, or an additional sequence for stability during recombinant production.

Polypeptides of the present invention can be prepared in any suitable manner, for instance by isolation from naturally occurring sources, from genetically engineered host cells comprising expression systems (*vide infra*) or by chemical synthesis, using for instance

automated peptide synthesizers, or a combination of such methods. The means for preparing such polypeptides are well understood in the art.

In a further aspect, the present invention relates to mGRR polynucleotides. Such polynucleotides include:

- (a) an isolated mGRR polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least 80%, 90%, 95%, 98%, or 99% identity to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 and which encodes for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR;
- (b) an isolated polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5;
- (c) an isolated polynucleotide having at least 80%, 90%, 95%, 98%, or 99% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 and which encodes for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR;
- (d) the isolated polynucleotide of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5;
- (e) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 80%, 90%, 95%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 and which encodes for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR;
- (f) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5;
- (g) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 80%, 90%, 95%, 98%, or 99% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 and which encodes for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR;
- (h) an isolated polynucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5;
- (i) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that has an Identity Index of 0.80, 0.90, 0.95, 0.98, or 0.99 compared to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 and which encodes for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR; or

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 13 -

k) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence that has an Identity Index of 0.80, 0.90, 0.95, 0.98, or 0.99 compared to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 1 SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 and which encode for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR; or
l) polynucleotides that are fragments or variants of the above mentioned polynucleotides or that are complementary to above mentioned polynucleotides, over the entire length thereof.

Preferred fragments of polynucleotides of the present invention include an isolated polynucleotide comprising a nucleotide sequence having at least 15, 30, 50 or 100 contiguous nucleotides from the sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5, or an isolated polynucleotide comprising a sequence having at least 30, 50 or 100 contiguous nucleotides truncated or deleted from the sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5.

Preferred variants of polynucleotides of the present invention include splice variants, allelic variants, and polymorphisms, including polynucleotides having one or more single nucleotide polymorphisms (SNPs).

Polynucleotides of the present invention also include polynucleotides encoding polypeptide variants that comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6.

In a further aspect, the present invention provides polynucleotides that are RNA transcripts of the DNA sequences of the present invention. Accordingly, there is provided an RNA polynucleotide that:

- (a) comprises an RNA transcript of the DNA sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6;
- (b) is the RNA transcript of the DNA sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6;
- (c) comprises an RNA transcript of the DNA sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5; or
- (d) is the RNA transcript of the DNA sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5; or
- (e) RNA polynucleotides that are complementary thereto.

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 14 -

The polypeptide of the SEQ ID NO: 2 or SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO:6 is related to other proteins of the G protein-coupled receptors family, having homology and/or structural similarity with GPCR - LYMST Jensen, C.P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91: 4816-4820,1994).

Preferred polypeptides and polynucleotides of the present invention are expected to have, inter alia, similar biological functions/properties to their homologous polypeptides and polynucleotides. Furthermore, preferred polypeptides and polynucleotides of the present invention have at least one activity of mGRR.

Polynucleotides of the present invention may be obtained using standard cloning and screening techniques from a cDNA library derived from mRNA in cells of the mammalian brain (see for instant, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Polynucleotides of the invention can also be obtained from natural sources such as genomic DNA libraries or can be synthesized using well known and commercially available techniques.

When polynucleotides of the present invention are used for the recombinant production of polypeptides of the present invention, the polynucleotide may include the coding sequence for the mature polypeptide, by itself, or the coding sequence for the mature polypeptide in reading frame with other coding sequences, such as those encoding a leader or secretory sequence, a pre-, or pro- or prepro- protein sequence, or other fusion peptide portions. For example, a marker sequence that facilitates purification of the fused polypeptide can be encoded. In certain preferred embodiments of this aspect of the invention, the marker sequence is a hexa-histidine peptide, as provided in the pQE vector (Qiagen, Qiagen AG; Basel, Switzerland) and described in Gentz et al., Proc Natl Acad Sci USA (1989) 86:821-824, or is an HA tag. The polynucleotide may also contain non-coding 5' and 3' sequences, such as transcribed, non-translated sequences, splicing and polyadenylation signals, ribosome binding sites and sequences that stabilize mRNA.

Polynucleotides that are identical, or have sufficient identity to a polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 may be used as hybridization probes for cDNA and genomic DNA or as primers for a nucleic acid amplification reaction (for instance,

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 15 -

PCR). Such probes and primers may be used to isolate full-length cDNAs and genomic clones encoding polypeptides of the present invention and to isolate cDNA and genomic clones of other genes (including genes encoding paralogs from human sources and orthologs and paralogs from species other than human) that have a high sequence similarity to SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5, typically of at least 95% identity. Preferred probes and primers will generally comprise at least 15 nucleotides, preferably, at least 30 nucleotides and may have at least 50, if not at least 100 nucleotides. Particularly preferred probes will have between 30 and 50 nucleotides. Particularly preferred primers will have between 20 and 25 nucleotides.

A polynucleotide encoding a polypeptide of the present invention, including homologs from species other than human, may be obtained by a process comprising the steps of screening a library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 or a fragment thereof, preferably of at least 15 nucleotides; and isolating full-length cDNA and genomic clones containing said polynucleotide sequence. Such hybridization techniques are well known to the skilled artisan. Preferred stringent hybridization conditions include overnight incubation at 42°C in a solution comprising: 50% formamide, 5xSSC (150mM NaCl, 15mM trisodium citrate), 50 mM sodium phosphate (pH7.6), 5x Denhardt's solution, 10 % dextran sulfate, and 20 microgram/ml denatured, sheared salmon sperm DNA; followed by washing the filters in 0.1x SSC at about 65°C. Thus the present invention also includes isolated polynucleotides, preferably with a nucleotide sequence of at least 100, obtained by screening a library under stringent hybridization conditions with a labeled probe having the sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 or a fragment thereof, preferably of at least 15 nucleotides. Human and (partial) rat sequences are 89 % identical on the nucleotide level and 89% identical and 90% similar on the amino acid level.

The person skilled in the art will appreciate that, in many cases, an isolated cDNA sequence will be incomplete, in that the region coding for the polypeptide does not extend all the way through to the 5' terminus. This is a consequence of reverse transcriptase, an enzyme with inherently low "processivity" (a measure of the ability of the enzyme to remain attached to the template during the polymerisation reaction), failing to complete a DNA copy of the mRNA template during first strand cDNA synthesis.

There are several methods available and well known to those skilled in the art to obtain full-length cDNAs, or extend short cDNAs, for example those based on the method of Rapid Amplification of cDNA ends (RACE) (see, for example, Frohman et al., Proc Nat Acad Sci USA 85, 8998-9002, 1988). Recent modifications of the technique, exemplified by the MARATHON technology (Clontech Laboratories Inc, BD Clontech, Basel, Switzerland) for example, have significantly simplified the search for longer cDNAs. In the MARATHON technology, cDNAs have been prepared from mRNA extracted from a chosen tissue and an 'adaptor' sequence ligated onto each end. Nucleic acid amplification (PCR) is then carried out to amplify the "missing" 5' end of the cDNA using a combination of gene specific and adaptor specific oligonucleotide primers. The PCR reaction is then repeated using 'nested' primers, that is, primers designed to anneal within the amplified product (typically an adaptor specific primer that anneals further 3' in the adaptor sequence and a gene specific primer that anneals further 5' in the known gene sequence). The products of this reaction can then be analysed by DNA sequencing and a full-length cDNA constructed either by joining the product directly to the existing cDNA to give a complete sequence, or carrying out a separate full-length PCR using the new sequence information for the design of the 5' primer.

Recombinant polypeptides of the present invention may be prepared by processes well known in the art from genetically engineered host cells comprising expression systems. Accordingly, in a further aspect, the present invention relates to expression systems comprising a polynucleotide or polynucleotides of the present invention, to host cells which are genetically engineered with such expression systems and to the production of polypeptides of the invention by recombinant techniques. Cell-free translation systems can also be employed to produce such proteins using RNAs derived from the DNA constructs of the present invention.

For recombinant production, host cells can be genetically engineered to incorporate expression systems or portions thereof for polynucleotides of the present invention. Polynucleotides may be introduced into host cells by methods described in many standard laboratory manuals, such as Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) and Sambrook et al. (ibid).

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 17 -

Preferred methods of introducing polynucleotides into host cells include, for instance, calcium phosphate transfection, DEAE-dextran mediated transfection, transfection, microinjection, cationic lipid-mediated transfection, electroporation, transduction, scrape loading, ballistic introduction or infection.

Representative examples of appropriate hosts include bacterial cells, such as Streptococci, Staphylococci, E coli, Streptomyces and Bacillus subtilis cells; fungal cells, such as yeast cells and Aspergillus cells; insect cells such as Drosophila S2 and Spodoptera Sf9 cells; animal cells such as CHO, COS, HeLa, C1 27, 3T3, BHK, HEK 293 and Bowes melanoma cells; and plant cells.

A great variety of expression systems can be used, for instance, chromosomal, episomal and virus-derived systems, e.g., vectors derived from bacterial plasmids, from bacteriophage, from transposons, from yeast episomes, from insertion elements, from yeast chromosomal elements, from viruses such as baculoviruses, papova viruses, such as SV40, vaccinia viruses, adenoviruses, fowl pox viruses, pseudorabies viruses and retroviruses, and vectors derived from combinations thereof, such as those derived from plasmid and bacteriophage genetic elements, such as cosmids and phagemids. The expression systems may contain control regions that regulate as well as engender expression. Generally, any system or vector that is able to maintain, propagate or express a polynucleotide to produce a polypeptide in a host may be used. The appropriate polynucleotide sequence may be inserted into an expression system by any of a variety of well-known and routine techniques, such as, for example, those set forth in Sambrook et al (see above). Appropriate secretion signals may be incorporated into the desired polypeptide to allow secretion of the translated protein into the lumen of the endoplasmic reticulum, the periplasmic space or the extracellular environment. These signals may be endogenous to the polypeptide or they may be heterologous signals.

If a polypeptide of the present invention is to be expressed for use in screening assays, it is generally preferred that the polypeptide be produced at the surface of the cell. In this event, the cells may be harvested prior to use in the screening assay. If the polypeptide is secreted into the medium, the medium can be recovered in order to recover and purify the polypeptide. If produced intracellularly, the cells must first be lysed before the polypeptide is recovered.

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 18 -

Polypeptides of the present invention can be recovered and purified from recombinant cell cultures by well-known methods including ammonium sulfate or ethanol precipitation, acid extraction, anion or cation exchange chromatography, phosphocellulose chromatography, hydrophobic interaction chromatography, affinity chromatography, hydroxylapatite chromatography and lectin chromatography. Most preferably, high performance liquid chromatography is employed for purification. Well known techniques for refolding proteins may be employed to regenerate active conformation when the polypeptide is denatured during intracellular synthesis, isolation and/or purification.

Polynucleotides of the present invention may be used as diagnostic reagents, through detecting mutations in the associated gene. Detection of a mutated form of the gene characterised by the polynucleotide of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 in the cDNA or genomic sequence and which is associated with a dysfunction will provide a diagnostic tool that can add to, or define, a diagnosis of a disease, or susceptibility to a disease, which results from under-expression, over-expression or altered spatial or temporal expression of the gene. Individuals carrying mutations in the gene may be detected at the DNA level by a variety of techniques well known in the art.

Nucleic acids for diagnosis may be obtained from a subject's cells, such as from blood, urine, saliva, tissue biopsy or autopsy material. The genomic DNA may be used directly for detection or it may be amplified enzymatically by using PCR, preferably RT-PCR, or other amplification techniques prior to analysis. RNA or cDNA may also be used in similar fashion. Deletions and insertions can be detected by a change in size of the amplified product in comparison to the normal genotype. Point mutations can be identified by hybridizing amplified DNA to labeled mGRR nucleotide sequences. Perfectly matched sequences can be distinguished from mismatched duplexes by RNase digestion or by differences in melting temperatures.

DNA sequence difference may also be detected by alterations in the electrophoretic mobility of DNA fragments in gels, with or without denaturing agents, or by direct DNA sequencing (see, for instance, Myers et al, Science (1985) 230:1242). Sequence changes at specific locations may also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S 1

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 19 -

protection or the chemical cleavage method (see Cotton et al., Proc Natl Acad Sci USA (1985) 85: 4397-4401).

An array of oligonucleotides probes comprising the mGRR polynucleotide sequence or fragments thereof can be constructed to conduct efficient screening of e.g., genetic mutations. Such arrays are preferably high density arrays or grids. Array technology methods are well known and have general applicability and can be used to address a variety of questions in molecular genetics including gene expression, genetic linkage, and genetic variability, see, for example, M.Chee et al., Science, 274, 610-613 (1996) and other references cited therein.

Detection of abnormally decreased or increased levels of polypeptide or mRNA expression may also be used for diagnosing or determining susceptibility of a subject to a disease of the invention. Decreased or increased expression can be measured at the RNA level using any of the methods well known in the art for the quantitation of polynucleotides, such as, for example, nucleic acid amplification, for instance PCR, RT-PCR, RNase protection, Northern blotting and other hybridization methods. Assay techniques that can be used to determine levels of a protein, such as a polypeptide of the present invention, in a sample derived from a host are well-known to those skilled in the art. Such assay methods include radioimmunoassays, competitive-binding assays, Western Blot analysis and ELISA assays.

Thus in another aspect, the present invention relates to a diagnostic kit comprising:

- (a) a polynucleotide of the present invention, preferably the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5, or a fragment or an RNA transcript thereof;
- (b) a nucleotide sequence complementary to that of (a);
- (c) a polypeptide of the present invention, preferably the polypeptide of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6 or a fragment thereof; or
- (d) an antibody to a polypeptide of the present invention, preferably to the polypeptide of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6.

It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component. Such a kit will be of use in diagnosing a disease or susceptibility to a disease, particularly diseases of the invention, amongst others.

The polynucleotide sequences of the present invention are valuable for chromosome localisation studies. The sequence is specifically targeted to, and can hybridize with, a particular location on an individual human chromosome. The mapping of relevant sequences to chromosomes according to the present invention is an important first step in correlating those sequences with gene associated disease. Once a sequence has been mapped to a precise chromosomal location, the physical position of the sequence on the chromosome can be correlated with genetic map data. Such data are found in, for example, V. McKusick, Mendelian Inheritance in Man (available on-line through Johns Hopkins University Welch Medical Library). The relationship between genes and diseases that have been mapped to the same chromosomal region are then identified through linkage analysis (co-inheritance of physically adjacent genes). Precise human chromosomal localisations for a genomic sequence (gene fragment etc.) can be determined using Radiation Hybrid (RH) Mapping (Walter, M. et al., (1994) A method for constructing radiation hybrid maps of whole genomes, Nature Genetics 7, 22-28). A number of RH panels are available from Research Genetics (Huntsville, AL, USA) e.g. the - GeneBridge4 RH panel (Gyapay G et al., Hum Mol. Genet. 1996 Mar; 5(3): 339-46). To determine the chromosomal location of a gene using this panel, 93 PCRs are performed using primers designed from the gene of interest on RH DNAs. Each of these DNAs contains random human genomic fragments maintained in a hamster background (human / hamster hybrid cell lines). These PCRs result in 93 scores indicating the presence or absence of the PCR product of the gene of interest. These scores are compared with scores created using PCR products from genomic sequences of known location. This comparison is conducted at <http://www.genome.wi.mit.edu/>.

The polynucleotide sequences of the present invention are also valuable tools for tissue expression studies. Such studies allow the determination of expression patterns of polynucleotides of the present invention that may give an indication as to the expression patterns of the encoded polypeptides in tissues, by detecting the mRNAs that encode them. The techniques used are well known in the art and include in situ hybridisation techniques to clones arrayed on a grid, such as cDNA microarray hybridisation (Schena et al, Science, 270, 467-470, 1995 and Shalon et al., Genome Res, 6, 639-645, 1996) and nucleotide amplification techniques such as PCR. A preferred method uses the TAQMAN™ technology available from Perkin Elmer. Results from these studies can provide an indication of the normal function of the polypeptide in the organism. In addition, comparative studies of the normal expression pattern of mRNAs with that of mRNAs encoded by an

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 21 -

alternative form of the same gene (for example, one having an alteration in polypeptide coding potential or a regulatory mutation) can provide valuable insights into the role of the polypeptides of the present invention, or that of inappropriate expression thereof in disease. Such inappropriate expression may be of a temporal, spatial or simply quantitative nature.

The chromosomal localization can also be inferred using public domain databases, for example ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/>). The human mGRR1 gene maps on human Chromosome 10 p11.2-p12, the human mGRR2 gene maps on human chromosome Chr 17q11.1.

A further aspect of the present invention relates to antibodies. The polypeptides of the invention or their fragments, or cells expressing them, can be used as immunogens to produce antibodies that are immunospecific for polypeptides of the present invention. The term "immunospecific" means that the antibodies have substantially greater affinity for the polypeptides of the invention than their affinity for other related polypeptides in the prior art. Antibodies generated against polypeptides of the present invention may be obtained by administering the polypeptides or epitope-bearing fragments, or cells to an animal, preferably a non-human animal, using routine protocols. For preparation of monoclonal antibodies, any technique which provides antibodies produced by continuous cell line cultures can be used. Examples include the hybridoma technique (Kohler, G. and Milstein, C., *Nature* (1975) 256:495-497), the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., *Immunology Today* (1983) 4:72) and the EBV-hybridoma technique (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).

Techniques for the production of single chain antibodies, such as those described in U.S. Patent No. 4,946,778, can also be adapted to produce single chain antibodies to polypeptides of this invention. Also, transgenic mice, or other organisms, including other mammals, may be used to express humanized antibodies.

The above-described antibodies may be employed to isolate or to identify clones expressing the polypeptide or to purify the polypeptides by affinity chromatography. Antibodies against polypeptides of the present invention may also be employed to treat diseases of the invention, amongst others.

Polypeptides and polynucleotides of the present invention may also be used as vaccines. Accordingly, in a further aspect, the present invention relates to a method for inducing an immunological response in a mammal that comprises inoculating the mammal with a polypeptide of the present invention, adequate to produce antibody and/or T cell immune response, including, for example, cytokine-producing T cells or cytotoxic T cells, to protect said animal from disease, whether that disease is already established within the individual or not. An immunological response in a mammal may also be induced by a method comprises delivering a polypeptide of the present invention via a vector directing expression of the polynucleotide and coding for the polypeptide in vivo in order to induce such an immunological response to produce antibody to protect said animal from diseases of the invention. One way of administering the vector is by accelerating it into the desired cells as a coating on particles or otherwise. Such nucleic acid vector may comprise DNA, RNA, a modified nucleic acid, or a DNA/RNA hybrid. For use a vaccine, a polypeptide or a nucleic acid vector will be normally provided as a vaccine formulation (composition). The formulation may further comprise a suitable carrier. Since a polypeptide may be broken down -in the stomach, it is preferably administered parenterally (for instance, subcutaneous, intramuscular, intravenous, or intradermal injection). Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous sterile injection solutions that may contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the recipient; and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that may include suspending agents or thickening agents.

The formulations may be presented in unit-dose or multi-dose containers, for example, sealed ampoules and vials and may be stored in a freeze-dried condition requiring only the addition of the sterile liquid carrier immediately prior to use. The vaccine formulation may also include adjuvant systems for enhancing the immunogenicity of the formulation, such as oil-in water systems and other systems known in the art. The dosage will depend on the specific activity of the vaccine and can be readily determined by routine experimentation.

Polypeptides of the present invention have one or more biological functions that are of relevance in one or more disease states, in particular the diseases of the invention hereinbefore mentioned. It is therefore useful to identify compounds that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide. Accordingly, in a further aspect, the present

invention provides for a method of screening compounds to identify those that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide. Such methods identify agonists or antagonists that may be employed for therapeutic and prophylactic purposes for such diseases of the invention as hereinbefore mentioned. Compounds may be identified from a variety of sources, for example, cells, cell-free preparations, chemical libraries, collections of chemical compounds, and natural product mixtures. Such agonists or antagonists so-identified may be natural or modified substrates, ligands, receptors, enzymes, etc., as the case may be, of the polypeptide; a structural or functional mimetic thereof (see Colligan et al., *Current Protocols in Immunology* 1(2): Chapter 5 (1991)) or a small molecule.

The screening method may simply measure the binding of a candidate compound to the polypeptide, or to cells or membranes bearing the polypeptide, or a fusion protein thereof, by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound. Alternatively, the screening method may involve measuring or detecting (qualitatively or quantitatively) the competitive binding of a candidate compound to the polypeptide against a labelled competitor (e.g. agonist or antagonist). Further, these screening methods may test whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide, using detection systems appropriate to the cells bearing the polypeptide. Inhibitors of activation are generally assayed in the presence of a known agonist and the effect on activation by the agonist by the presence of the candidate compound is observed. Further, the screening methods may simply comprise the steps of mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide of the present invention, to form a mixture, measuring a HGRL101 activity in the mixture, and comparing the HGRL101 activity of the mixture to a control mixture which contains no candidate compound.

Polypeptides of the present invention may be employed in conventional low capacity screening methods and also in high-throughput screening (HTS) formats. Such HTS formats include not only the well-established use of 96- and, more recently, 384-well microtiter plates but also emerging methods such as the nanowell method described by Schullek et al, *Anal Biochem.*, 246, 20-29, (1997).

Fusion proteins, such as those made from Fc portion and mGRR polypeptide, as hereinbefore described, can also be used for high-throughput screening assays to identify

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 24 -

antagonists for the polypeptide of the present invention (see D. Bennett et al., *J Mol Recognition*, 8:52-58 (1995); and K. Johanson et al., *J Biol Chem*, 270(16):9459-9471 (1995)).

The polynucleotides, polypeptides and antibodies to the polypeptide of the present invention may also be used to configure screening methods for detecting the effect of added compounds on the production of mRNA and polypeptide in cells. For example, an ELISA assay may be constructed for measuring secreted or cell associated levels of polypeptide using monoclonal and polyclonal antibodies by standard methods known in the art. This can be used to discover agents that may inhibit or enhance the production of polypeptide (also called antagonist or agonist, respectively) from suitably manipulated cells or tissues.

A polypeptide of the present invention may be used to identify membrane bound or soluble receptors, if any, through standard receptor binding techniques known in the art. These include, but are not limited to, ligand binding and crosslinking assays in which the polypeptide is labeled with a radioactive isotope (for instance, ¹²⁵I), chemically modified (for instance, biotinylated), or fused to a peptide sequence suitable for detection or purification, and incubated with a source of the putative receptor (cells, cell membranes, cell supernatants, tissue extracts, bodily fluids). Other methods include biophysical techniques such as surface plasmon resonance and spectroscopy. These screening methods may also be used to identify agonists and antagonists of the polypeptide that compete with the binding of the polypeptide to its receptors, if any. Standard methods for conducting such assays are well understood in the art.

Examples of antagonists of polypeptides of the present invention include antibodies or, in some cases, oligonucleotides or proteins that are closely related to the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc., as the case may be, of the polypeptide, e.g., a fragment of the ligands, substrates, receptors, enzymes, etc.; or a small molecule that bind to the polypeptide of the present invention but do not elicit a response, so that the activity of the polypeptide is prevented.

Screening methods may also involve the use of transgenic technology and the mGRR gene. The art of constructing transgenic animals is well established. For example, the

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 25 -

mGRR gene may be introduced through microinjection into the male pronucleus of fertilized oocytes, retroviral transfer into pre- or post-implantation embryos, or injection of genetically modified, such as by electroporation, embryonic stem cells into host blastocysts. Particularly useful transgenic animals are so-called "knock-in" animals in which an animal gene is replaced by the human equivalent within the genome of that animal. Knock-in transgenic animals are useful in the drug discovery process, for target validation, where the compound is specific for the human target. Other useful transgenic animals are so-called "knock-out" animals in which the expression of the animal ortholog of a polypeptide of the present invention and encoded by an endogenous DNA sequence in a cell is partially or completely annulled. The gene knock-out may be targeted to specific cells or tissues, may occur only in certain cells or tissues as a consequence of the limitations of the technology, or may occur in all, or substantially all, cells in the animal. Transgenic animal technology also offers a whole animal expression-cloning system in which introduced genes are expressed to give large amounts of polypeptides of the present invention.

Screening kits for use in the above described methods form a further aspect of the present invention. Such screening kits comprise:

- (a) a polypeptide of the present invention;
- (b) a recombinant cell expressing a polypeptide of the present invention,
- (c) a cell membrane expressing a polypeptide of the present invention; or
- (d) an antibody to a polypeptide of the present invention; which polypeptide is preferably that of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6.

It will be appreciated that in any such kit, (a), (b), (c) or (d) may comprise a substantial component.

All publications and references, including but not limited to patents and patent applications, cited in this specification are herein incorporated by reference in their entirety as if each individual publication or reference were specifically and individually indicated to be incorporated by reference herein as being fully set forth. Any patent application to which this application claims priority is also incorporated by reference herein in its entirety in the manner described above for publications and references.

The following examples illustrate the invention.

Examples**Example 1: Cloning of human mGRR1a and human mGRR1b**

Using the amino acid sequence of GABA-B receptors (accessions Y10370, AJ011318) as queries in a blastn search of the Celera human genomic database a sequence was identified (GA_15234422) with limited similarity to putative transmembrane domains of GABA-B and metabotropic glutamate receptors.

To clone the corresponding cDNA 5'- and 3'- RACE reactions are performed using Clontech Marathon RACE cDNA (human brain, cat. no. 7400-1, BD Clontech, Basel, Switzerland) essentially as described by the manufacturer. cDNA is transcribed from poly A(+) RNA (total human brain) purchased from Clontech (cat. no. 6543-1). The GIBCO-BRL cDNA synthesis module (Life Technologies, Basel, Switzerland) is used according to the manufacturer's instruction. Single-stranded cDNAs are synthesized using both oligo(dT) and random primers in separate reactions (2.5µg of each RNA, 20µl). Before use in PCR 10mM Tris, 1mM EDTA pH 8.5 (TE) is added to the cDNA synthesis reactions to a final volume of 100µl. PCRs are carried out on a MWG Primus cyclor. Equal volumes from oligo (dT) and random primer cDNA synthesis reactions are combined. 1µl cDNA mixture is used in a 50µl PCR reaction (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

RACE primers designed from sequence GA_15234422 are: 5'-RACE: 5'-GCG GGG CTC ATG GAA TGC CGA TGG GAC-3' (SEQ ID NO: 9) and 3'-RACE: 5'-GTC CCA TCG GCA TTC CAT GAG CCC CGC-3' (SEQ ID NO: 10). 35 cycles are performed on a MWG Biotech cyclor (initial denaturation at 95°C for 3, 95°C for 30 seconds (denaturation), 72°C for 4 min (annealing and extension)). Advantage polymerase as outlined in the Clontech Marathon RACE kit description is used. A second PCR amplification step is performed using a nested gene-specific primer set (5'-RACE: 5'-CCG CAC TGC ATA GCA GAG ATA AAC ACC-3' (SEQ ID NO: 7) and 3'-RACE: 5'-CAA TGA GCT CAT CAT CTC TGC TAT ATT CC-3' (SEQ ID NO: 8)) that are used together with the AP2 primers supplied with the Marathon cDNA kit. 30 PCR cycles are performed using the conditions as above. RACE clones are subcloned into pCRII-topo (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) and sequenced. By blastn searches of public domain databases (genbank) part of the 3'-RACE sequences are observed to be identical to a previously published sequence, KIAA1136 (accession AB032962). This sequence has been submitted to genbank as a partial cDNA sequence of unknown function cloned from brain.

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 27 -

The sequence information obtained from RACE clones is used to design primer sequences for cloning of the entire open reading frames. The PCR primers used for mGRR1a are: 5'-CAC CAT GGC TTA CCC CTT ACT CCT CTG C-3' (SEQ ID NO: 11) and 5'-CGT TGT TGC TCT TGC CCC CCT GGT CCT C-3' (SEQ ID NO: 12). The 5'-primer contains upstream the putative start codon the minimal Kozak consensus sequence CACC (Kozak, Nucl Acid Res., 1987, 15, 8125-8132). The primers for mGRR1b are: 5'-GTG GGA CCA GCT GTG CTG CCA TTG ATC-3' (SEQ ID NO: 13) and 5'-CGT TGT TGC TCT TGC CCC CCT GGT CCT C-3' (SEQ ID NO: 14). Using 1 μ l total human brain cDNA mixture (as described above) as template 35 PCR cycles are performed at: initial denaturation at 95°C for 3, 95°C for 30 seconds (denaturation), 65°C for 30 seconds, 72°C for 8 min. Proofreading Pfu polymerase from Promega (Wallisellen, Switzerland) is used. The cDNAs are sequenced (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3) and inserted into a mammalian expression vector (pcDNA3.1-topo, Invitrogen).

One polypeptide of the present inventions (mGRR1a, corresponding DNA sequence SEQ ID NO: 1) contains an open reading frame for a protein of 1212 amino acids (SEQ ID NO: 2). A putative signal peptide sequence (MAYPLLLCLLLAQLGLG (SEQ ID NO: 15)) is located at the very N term of SEQ ID NO: 2 suggesting an extracellular location of the N terminal protein sequence. A sequence corresponding to an N-terminal splice variant of mGRR1; termed mGRR1b (SEQ ID NO: 4), contains an open reading frame of 1183 amino acids (SEQ ID NO: 5). The deduced protein sequences have the structural features characteristic of family 3 G protein-coupled receptors: 1) Hydrophobicity plots predict a protein with 7 putative transmembrane domains. 2) Similarity to family 3 GPCRs is substantiated by blastp searches (local alignments of putative transmembrane regions): 21 % identical and 45% similar residues are found for mGRR1a compared to *drosophila melanogaster* metabotropic glutamate receptor (accession P91685); 22 % identical and 43% similar residues are found for mGRR1a compared to putative *drosophila melanogaster* putative metabotropic GABA-B receptor subtype 3 (accession AF318274, local alignments of putative transmembrane regions). Closest homolog to mGRR1a in the *drosophila* genome is putative gene product CG11923 (flybase accession FBgn0031642) with 27% identical and 43% similar residues (blastp local alignment residues 241-745 of SEQ ID NO: 2 with residues 109-588 of CG11923). The function of CG11923 has been classified as G protein linked receptor. Closest mammalian GPCR homolog in public domain databases is metabotropic glutamate receptor type 3 (accession Q14832) with 23 % identical and 41% similar residues (local alignment residues 385 to 640 of SEQ ID NO: 2 with residues 540-

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 28 -

801 of mGluR3). Similarity of mGFRF to family 3 GPCRs is restricted to the putative transmembrane spanning regions. No significant similarity to any known proteins is found for the N-terminal putatively extracellular domain as well as for the C-terminal putatively intracellular domain of mGFRF.

Transmembrane domain	Position (SEQ ID 2)	Length
I	415-437	23
II	447-469	23
III	483-505	23
IV	523-545	23
V	580-602	23
VI	618-640	23
VII	647-669	23

Table 2: Putative transmembrane regions of mGFRF1a.

Example 2: Cloning of human mGFRF2

Using the amino acid sequence of GABA-B receptors (accessions Y10370, AJ011318) as queries in a tblastn search of the Celera human genomic database a sequence was identified (GA_15091955) with limited similarity to putative transmembrane domains of GABA-B and metabotropic glutamate receptors.

To clone the corresponding cDNA 5'- and 3'- RACE reactions are performed using Clontech Marathon RACE cDNA (human brain, cat. no. 7400-1, BD Clontech, Basel, Switzerland) essentially as described by the manufacturer. cDNA is transcribed from poly A(+) RNA (total human brain) purchased from Clontech (cat. no. 6543-1). The GIBCO-BRL cDNA synthesis module (Life Technologies, Basel, Switzerland) is used according to the manufacturer's instruction. Single-stranded cDNAs are synthesized using both oligo(dT) and random primers in separate reactions (2.5µg of each RNA, 20µl). Before use in PCR 10mM Tris, 1mM EDTA pH 8.5 (TE) is added to the cDNA synthesis reactions to a final volume of 100µl. PCRs are carried out on a MWG Primus cyclor. Equal volumes from oligo (dT) and random primer cDNA synthesis reactions are combined. 1µl cDNA mixture is used in a 50µl

PCR reaction (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)).

RACE primers designed from sequence GA_15091955 are: 5'-RACE: 5'-CCC GCT GCT CAG AAG GGC ACT CCG CTG G-3' (SEQ ID NO: 24) and 3'-RACE: 5'-TGG ACC GTG GGC GCC CTG GAG CGA GGC-3' (SEQ ID NO: 25). 35 cycles are performed on a MWG Biotech cycler (initial denaturation at 95°C for 3, 95°C for 30 seconds (denaturation), 72°C for 4 min (annealing and extension)). Experimental procedures as described in the Clontech Marathon RACE kit description are used. A second PCR amplification step is performed using a nested gene-specific primer set (5'-RACE: 5'-GGG CCG TTC GAG ACA GAA ACA GCT GCA G -3' (SEQ ID NO: 27) and 3'-RACE: 5'-GCT GGG ACT ACA TCA TGG TTG TGG CTG -3' (SEQ ID NO: 26) that are used together with the AP2 primers supplied with the Marathon cDNA kit. 30 PCR cycles are performed using the conditions as above. RACE clones are subcloned into pCRII-topo (Invitrogen, Groningen, The Netherlands) and sequenced.

The sequence information obtained from RACE clones is used to identify corresponding genomic sequences and the mGRR2 gene locus on human Chr 17q11.1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human>). Transcribed sequences are predicted by the genscan program (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) and PCR primers are designed covering the putative open reading frame. The primer pairs are: 5'-CAC CGC CTC TGC CTG GGC TCT CCT G-3'(F1) (SEQ ID NO: 28) and 5'-CGC TGC TCA GAA GGG CAC TCC GCT GG-3' (SEQ ID NO: 29); 5'-GGA TTC CTG CTG CTT TAC TTT CCT GTC-3' (SEQ ID NO: 30) and 5'-CCA CAG ACA CAC TTC AGC AAT GCC-3' (SEQ ID NO: 31); 5'-CCA GGA AGG TGG AGA AGC CTG GGT GGG-3' (SEQ ID NO: 32) and 5'-CTA ACT TGC CCT GTA GCA CTC CTC-3' (R1) (SEQ ID NO: 33). Using 1 µl total human brain cDNA mixture (as described above) as template 35 PCR cycles are performed at: initial denaturation at 95°C for 3, 95°C for 30 seconds (denaturation), 62-68°C for 30 seconds, 72°C for 8 min. Proofreading Pfu polymerase from Promega (Wallisellen, Switzerland) is used. The full length sequence is assembled by splicing through overlap extension (*Methods Enzymol.* 1993; 217:270-279) in a PCR reaction using Pfu polymerase and primers F1 and R1 as above (25 PCR cycles are performed at: initial denaturation at 95°C for 3, 95°C for 30 seconds (denaturation), 68°C for 30 seconds, 72°C for 14 min) and the cDNA sequences inserted into a mammalian expression vector (pcDNA3.1-zeo, Invitrogen). One polypeptide of the present inventions (mGRR2, corresponding DNA sequence SEQ ID NO: 5) contains an open reading frame for a protein of 2367 amino acids (SEQ ID NO:6). A

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 30 -

putative signal peptide sequence MGTRGAVMPPPMWGLLGCCFVCAWALG (SEQ ID NO: 34) is located at the very N term of mGRR2 polypeptide (SEQ ID NO: 6) suggesting an extracellular location of the N terminal protein sequence. The amino acid sequence of hmGRR2 is 51 % identical to mGRRa with 58% similar residues (bestfit alignment of amino acid residues 81 to 770 of mGRRa with residues 61 to 737 of mGRR2).

Expression profiling by PCR using cDNAs derived from different brain regions (Clontech) and RACE primers as above reveals reveal a widespread distribution of the mGRR2 mRNA in brain with an overlapping expression profile compared to mGRR1a/b.

Example 3: Cloning of partial rat mGRR1

A rat mGRR1 cDNA clone is identified in a arrayed dorsal root ganglion cDNA library (Novartis origin) using the human mGRR1a sequence (SEQ ID NO: 1) as query in a blastn search. Plasmid DNA from this clone is isolated and the cDNA insert partially sequenced (SEQ ID NO: 16); the nucleotide sequence is 80% identical to the corresponding human mGRR1 and b sequence (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3).

Example 4: Mammalian cell expression (In situ hybridisation)

As templates for the synthesis of ³²P-UTP sense and antisense riboprobes fragments of the rat mGRR cDNA (SEQ ID NO: 16) are amplified by PCR using primers with attached T7 promoter sequences. The primer sequences are 5'-AAT GGA AGT CAG TTG TAC AC-3' (SEQ ID NO: 17) and 5'-TTA TAC ACT CAC TAT AGG GAA ATG TCC CTT TAA CAG GCT G-3' (SEQ ID NO: 18) (antisense template) and 5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA AAT GGA AGT CAG TTG TAC AC-3' (SEQ ID NO: 19) and 5'-AAT GTC CCT TTA ACA GGC TG-3' (SEQ ID NO: 20) (sense template). 25 PCR cycles are performed on a MWG primus cyclor using 50ng of template plasmid (rat mGRR, SEQ ID NO: 16). PCR conditions are 95°C for 30 seconds (denaturation), 68°C for 1min (annealing), and 72°C for 1min (extension). PCR products of the expected size (590bp) are obtained, purified through spin columns (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA, cat no. 1 732 668) and used for the synthesis of ³⁵S-labeled RNA probes.

Probe synthesis is carried out with an RNA transcription kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) as follows: 6 μ l of [α -³⁵S]UTP and 6 μ l of [α -³⁵S]ATP (specific activity 1200 Ci/mmol, NEN, Boston, MA, USA) are evaporated in a 1.5 ml tube. Afterwards 2 μ l 5x transcription buffer, 1 μ l 100 mM DTT, 3 μ l DEPC-H₂O, 1 μ l of a solution containing 10 μ l 100 mM CTP, 10 μ l 100

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 31 -

mM GTP, 30 μ l DEPC-H₂O), 1 μ l RNasin, 1 μ l of T7 or T3 polymerase and 200ng of PCR product is added. After 1-1.5h of incubation at 37°C, the reaction is stopped by adding 90 μ l of a solution containing 50 μ l SDS 20%, 100 μ l 0.1M DDT and 850 μ l of 10 mM Tris - 1 mM EDTA pH 7.4). After purification on a sephadex G-50 spin-column (Boehringer, Mannheim, Germany), the radioactivity is measured by scintillation counting. The hybridization mixture is prepared from two separate solutions: Solution A contained 10 ml formamide, 4 ml 50% dextran sulfate, 400 μ l 50 x Denhard's solution (5 g ficoll, 5 g polyvinylpyrrolidone and 5 g bovine serum albumine in 500 ml H₂O), 40 μ l 0.5 M EDTA pH 8.0, 200 μ l 1 M Tris pH 8.0 and 1.2 ml 5 M NaCl; Solution B is composed of 1-5 μ l of the ³⁵S-labeled probe (the exact volume is defined as to reach a concentration of 10⁷ cpm/ml in the final medium), 100 μ l tRNA, 100 μ l 0.1 M DTT, completed with DEPC-H₂O to 2 ml and heated at 65°C for 5 min. The final hybridization mixture is made up with 8 ml of solution A and 2 ml of solution B, well mixed, syringe filtered, heated again 5 min at 65°C and centrifuged for 5 min at 10'000g to remove air bubbles.

Rat brains are cut into 8 to 16 μ m thick coronal sections on a cryostat at -20 to -25°C and mounted onto a gelatine-poly-L-lysine-coated slides. The sections are vacuum-dried overnight at room temperature, fixed for 5 min in 4% (w/v) ice-cold paraformaldehyde, washed 3 times 1 min in 1x PBS. They are either used the same day for hybridization or stored in sealed slide boxes at -70°C.

On the day of the hybridization, the frozen slide boxes are kept closed until room temperature is reached. Then, the slides are dipped successively into staining dishes containing 250 ml 0.3 M triethanolamine, acetylated with the same triethanolamine added with 625 μ l acetic anhydride, dehydrated in graded ethanol (50, 70, 95, 100, 100%) and vacuum-dried for 1-3h. 75 μ l of the hybridization mixture is pipetted on a coverslip. At the contact with the glass slide, the solution spreads uniformly by capillarity all over the sections. Once sealed with DPX, the slides are placed and kept at 56°C for 16-20h. The slides are then cooled at room temperature, the hardened DPX is removed and the slides are dipped into a 4x SSC buffer for 20 min or more until the coverslips came off. The high stringency wash in 0.1x SSC is at 68°C. For emulsion-clipping, the sections are defatted 5 min in 95% ethanol, 3 times 5 min in 100% ethanol, once 5 min in xylene, once 30 min and 3 times again in 100% ethanol (same solution as before), and vacuum-dried for at least 1h. Then, in the dark-room, the liquid nuclear emulsion (Kodak, NTB2, Integra Biosciences AG,

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 32 -

Wallisellen, Switzerland, state/country) is diluted 1:1 in distilled water pre-heated at 52°C. The mixture is allowed to dissolve for 15 min in a 52°C water bath. Then, solution is very gently agitated by 180° rotations to mix well but avoiding bubble formation, rested for another 15 min. The homogeneous mixture is poured into a special dipping flask and kept again for 15 min to let the bubble come off. Then, the slides are dipped once into the emulsion and dried on a holder in a dark chamber for 3h. The slides are stored in sealed slide-boxes at 4°C in the dark-room. After 16 to 60d exposure, the slides are proceeded for development. The developer D-19 and fixer (Kodak) used at standard concentration are cooled to 15°C in ice. The slides are then dipped into to developer for 3.5 min, washed in 15°C water for 15 sec and fixed for 6 min. Finally, they are washed in demineralized water for 1h. The sections are counterstained or the slides are directly mounted for microscopic examination with 3 drops of histological mounting medium (Permount, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, USA) before placing a coverslip and dried in slide-boxes for several days until the coverslips strongly adhered.

The observed brain specific regional distribution of mGRR mRNA provides information on possible indications for mGRR ligands. mGRR ligands are the natural ligand as well as modulators of mGRR activity, such as anti-mGRR antibodies and/ or small molecules that agonize or antagonize mGRR-mediated signalling. Family 3 GPCRs such as metabotropic glutamate receptors and GABA-B receptors modulate synaptic transmission and in comparison to ion channel their effects are rather long-lasting and modulatory. The mRNA expression pattern in the brain of mGRR provides an indication that mGRR interacting molecules will have utility for treating neurological and/ or psychiatric diseases, including but not limited to dementia, schizophrenia, depression, affective disorders, epilepsy, and motoric disorders.

The polypeptides of the present invention are expressed in all major brain structures (Table 1).

Brain areas, nuclei or cell types	Expression level
Main olfactory bulb	
Periglomerular cells	+
Mitral cells	+++
Granule cells	+

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 33 -

Tufted cells	
Internal	++
External	+++
Basal forebrain	
Caudate putamen	+++
Globus pallidus	0
Nucleus Accumbens	++
Olfactory Tubercle	++
Islands of Calleja	0
Ventral pallidum	++
Amygdaloid nuclei	
Basolateral nuclei	+
Anterior	
Posterior	
Basomedial nuclei	++
Central nucleus, lateral	+
Medial nucleus	+
Posteroventral	
Posterodorsal	
Lateral nucleus	+++
Ventromedian/ventrolateral	
Dorsolateral	
Posteromedial cortical amyg nuc.	++
Septal area	
Lateral septum	++
Medial septum	
Bed Nucleus Stria terminalis	
Hippocampal formation	
Pyramidal layer CA1	++
Pyramidal layer CA3	+++
Dentate gyrus, granular layer	++
Hilar cells	++++
Other nonprincipal cells	+++

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 34 -

Subiculum dorsal	+
Thalamus	
Dorsal Thalamus	
Anterior group	
Laterodorsal, ventrolateral (LDVL)	++
Laterodorsal, dorsomedial (LDDM)	++
Dorsal group (IMD)	++
Lateral group	
Lateral posterior mediodorsal (LPMR)	++
Medial group	
Paraventricular (PVP)	+
Mediodorsal (MDM), medial	+++
Mediodorsal (MDC), centrolateral	+++
Ventral group	
Ventral medial (VM)	+++
Ventral posteromedial (VPM)	+
Ventral posterolateral (VPL)	+
Posterior group	++
Reuniens	+
Geniculate group	
Medial geniculate nuclei	
Lateral geniculate nuclei, dorsal	++
Lateral geniculate nuclei, ventral	++
Epithalamus	
Medial habenula	++
Lateral habenula	++
Ventral thalamus	
Zona incerta	+
Reticular thalamic nucleus	+
Subthalamic nucleus	
Hypothalamus	
Median preoptic nucleus	+
Periventricular nucleus	+
Medial preoptic area	+
Lateral preoptic area	+

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 35 -

Anteroventral preoptic nucleus	+
Anterior medial preoptic nucleus	+
Nucleus of the diagonal band	+
Magnocellular preoptic nucleus	+
Arcuate nucleus	+
Dorsomedial hypothalamic (DMD)	+
Ventromedial hypothalamic	
Dorsomedial (VMHDM)	+
Ventrolateral (VMHVL)	+
Supraoptic nucleus	+
Mammillary bodies	++
Paraventricular hypothalamic nucleus	+
Midbrain/Brainstem	
Substantia nigra	
Pars compacta	+++
Pars reticulata	0
Ventral tegmental area	++++
Interpeduncular nucleus	+
Mesencephalic reticular nucleus	++
Superior colliculi	
Superficial gray layer	++
Optical layer	++
Inferior colliculi	++
Periaqueductal gray	+
Ventral cochlear nucleus	+
Locus coeruleus	+++
Raphe nucleus dorsalis	+
Pons-Medulla	
Pontine nucleus	+++
Mesencephalic trigeminal nucleus	+++
Central gray pontine	++
Parabrachial nucleus	+++
Lateral superior olive	+++
Inferior olive	+++
Mesencephalic vestibular nucleus	++
Nucleus solitary tract	++

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 36 -

Cortex	
Frontal	
Layer I	+
Layer II-III	++
Layer V	+++
Layer VI	+
Parietal	
Layer I	+
Layer II-III	++
Layer IV	++++
Layer V	+++
Layer Via	+
Layer Vib	++
Piriform cortex	+++
Indesium griseum	+++
Cerebellum	
Molecular layer	+
Granular layer	++
Purkinje cells	0
Golgi cells	++++
Deep cerebellar nucleus (lateral)	+
White matter areas (glial cells)	
Anterior commissural	0
Fornix	0
Lateral olfactory tract	0
Corpus callosum	0

Table 1: Distribution of mRNA coding for mGRR1 throughout the rat brain. The hybridization probe used corresponds to C-terminal sequences that are common to mGRR1a and mGRR1b (pan probe). Levels of expression were estimated on coronal and sagittal brain section under darkfield microscope after having been exposed to nuclear emulsion for 10 days. 0=no detectable expression; + = weak; ++ = moderate; +++ = high; ++++ = very high.

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 37 -

The observed brain specific regional distribution of mGRR mRNA provides information on possible indications for mGRR ligands. mGRR ligands are the natural ligand as well as modulators of mGRR activity, such as anti-mGRR antibodies and/ or small molecules that agonize or antagonize mGRR-mediated signaling. Family 3 GPCRs such as metabotropic glutamate receptors and GABA-B receptors modulate synaptic transmission and in comparison to ion channel their effects are rather long-lasting and modulatory.

Example 5: Immunoblot

Generation of HA tagged mGRR1a. A C-terminal hemagglutinin (HA) epitope (nucleotide sequence 5'-TATCCATATGATGTTCCAGATTATGCT (SEQ ID NO: 21) was added to the C-terminal sequence of mGRR1a. To this end, a PCR reaction was performed with the primers 5'-CAAGACTCCAGTTCTCCAGAG (SEQ ID NO: 22) and 5'-TCTAGATCTAGACTAAGCATAATCTGGAACATCATATGGATACACTTTAAACTATCCAGATC (SEQ ID NO: 23) using human mGRR1a in pcDNA3.1 topo as template (50ng). 25 PCR cycles were performed at 95°C (30 sec), 68°C (30 sec), 72°C (30 sec). A PCR product of the expected size (417 bp) was obtained, double-digested with BsgI and XbaI, gel purified (Qiaex, Qiagen) and used to replace the BsgI / XbaI fragment of wild-type hmGRR1a in pcDNA3 topo. The construct was confirmed by sequencing of both strands.

Immunoblot. Membranes from transfected COS 1 cells were thawed, centrifuged and resuspended in HEPES buffer pH (125mM NaCl, 5mM KCl, 0.6mM MgCl₂, 1.8 mM CaCl₂, 20mM HEPES, 6mM Dextrose; (Life Technologies #043-90174M)), 50µg/ml Dnase I and diluted in sample buffer (125 mM Tris pH6.8, 1% SDS, 25mM DTT, 5% glycerol/bromphenol blue). Proteins (20 µg per lane) were separated by SDS-PAGE using 4-15% gradient gels and electrophoretically transferred onto Immobilon-P PVDF membranes (Millipore AG, Volketswil, Switzerland). Non-specific binding was reduced by overnight incubation in NET-G buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-Cl pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.05 % (v/v) Triton X100, 0.25 %w/v gelatine). Subsequently the membranes were incubated with a monoclonal rat anti-HA-Peroxidase high affinity antibody (3F10; Roche cat no. 2013819, 1:500in NET-G for 45 min at room temperature. After 3 washes with NET-G (10 min each) bound antibody was detected using the with enhanced chemiluminescent Western Blot reagents (Amersham Life Sciences #2106) and the membranes exposed to Biomax MR (Kodak) films.

Western blots of membranes from COS-1 cells after transfection with human GRR-HA in pcDNA3.1-topo (Gibco Life Sciences) shows a protein band at 134 kDa (as predicted from

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 38 -

its protein sequence). The immunoblot indicates as it is done with cellular membranes that mGRR is found at the cellular membrane.

Example 6: Functional analysis

mGRR1a, mGRR1b and mGRR2 may be co-expressed in recombinant expression systems such as HEK293 cells or COS cells together with putative interacting receptor proteins. Co-transfection of cDNA expression constructs may be for example done with the Effectene transfection agent (Qiagen). A functional read-out may involve analysis of agonist induced GTPyS binding such as described by Galvez *et al.*, *Mol. Pharmacol.*, 57, 419-426 (2000) or the activation of potassium channels (Lingenhoehl *et al.*, *Neuropharmacology*, 38, 1667-1673 (1999)). Co-transfection of G proteins or chimeric G proteins may be used to generate a calcium signal (inositol phosphate accumulation) that may be measured as described (Galvez *et al.*, *EMBO J.*, 20, 2152-2159 (2001)). Alternatively the binding of radiolabelled candidate ligands may be measured using membrane preparations derived from transfected cells. In addition, the following experiments may elucidate the function of mGRR1 and mGRR2:

a) Gene knockouts

The murine mGRR1 and mGRR2 genes are localized on proximal Chr 2 and distal Chr 11, respectively. This knowledge of the murine mGRR genes and their structure is used to design gene targeting constructs with the aim to generate mice in which the functions of mGRR1 and/ or mGRR2 gene has been ablated. Knockout animals are generated by standard methods as described (*Neuron*. 2001; 31, 47-58) involving either constitutive or inducible knockouts. The phenotype of homozygous knockout mice is investigated in biochemical, pharmacological and electrophysiological paradigms in order to study a possible impairment of known biochemical and receptor pathways. The animals are also investigated in different behavioral paradigms (for example as described in (*Neuron*. 2001; 31, 47-58).

With CG11923 a putative drosophila homolog of mammalian mGRRs has been identified. The phenotype of drosophila flies in which the function of CG11923 has been disrupted by means of P element mutagenesis is investigated. The results are expected to shed light on the functions of mGRR1 and mGRR2 *in vivo*.

b) Interacting proteins

Using C or N terminal sequences as baits interacting proteins of mGRR1 and mGRR2 are identified. This involves yeast two hybrid screens of brain cDNA libraries as well as the generation of GST fusion proteins for subsequent pull down assays using brain extracts and mass spectroscopic analysis of proteins. The abovementioned methods are also used to investigate a possible heterodimeric interaction of mGRR1 and mGRR2. Potential interacting proteins are investigated in co-localization experiments in transfected cells and in neuronal cultures. In addition co-immunoprecipitation experiments are performed. At the very Cterm of human mGRR1a/b a putative type II PDZ protein binding motif (J Biol Chem. 2002, 277, 15221-4) is identified suggesting that interaction of mGRR1a/b with known PDZ motif binding proteins such as PICK1 may direct mGRR to known GPCR signalling pathways (EMBO J. 2002, 21, 2990-9.) A putative interaction of human mGRR1 with PICK1 is investigated using co-localization and co-immunoprecipitation studies as described above.

c) Ligand fishing screen

A collection of putative GPCR ligands has been established in house. A bank of putative receptor ligands has been assembled for screening. The bank comprises: transmitters, hormones and chemokines; naturally occurring compounds which may be putative agonists for a human receptor, non-mammalian, biologically active peptides for which a mammalian counterpart has not yet been identified; and compounds not found in nature, but which activate receptors with unknown natural ligands. This bank is used to initially screen the receptor for known ligands, using both functional (i.e. calcium, cAMP, microphysiometer, oocyte electrophysiology, etc, see below) as well as binding assays. mGRR1 and mGRR2 are co-expressed in recombinant expression systems such as HEK293 cells or COS cells together with putative interacting receptor proteins (as above). This may also involve co-expression of mGRR1 and mGRR2. Co-transfection of cDNA expression constructs is for example done with the Effectene transfection agent (Qiagen). A functional read-out may involve analysis of agonist induced GTPyS binding such as described by Galvez *et al.*, Mol. Pharmacol., 57, 419-426 (2000) or the activation of potassium channels (Lingenhoehl *et al.*, Neuropharmacology, 38, 1667-1673 (1999)). Co-transfection of G proteins or chimeric G proteins are used to generate a calcium signal (inositol phosphate accumulation) that is measured as described (Galvez *et al.*, EMBO J, 20, 2152-2159 (2001). Alternatively the

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 40 -

binding of radiolabelled candidate ligands is measured using membrane preparations derived from transfected cells.

d) Extract/cell supernatant screening

A large number of mammalian receptors exist for which there remains, as yet, no cognate activating ligand (agonist). Thus, active ligands for these receptors may not be included within the ligands banks as identified to date.

Accordingly, the receptor of the invention is also functionally screened (using calcium, cAMP, microphysiometer, oocyte electrophysiology, etc., functional screens) against tissue extracts to identify natural ligands. Extracts that produce positive functional responses can be sequentially subfractionated until an activating ligand is isolated identified.

e) Antibodies and Peptides

Antibodies (polyclonal or monoclonal) are generated directed against N and C-terminal epitopes of mGRR. Peptides are designed that are expected to disrupt the association of mGRR proteins with putative interacting proteins as identified (such as PICK1 as above). Antibodies and or peptides are applied to cultured neuronal cells with the aim to disrupt the function of endogenously expressed mGRR proteins. The electrophysiological properties of antibody and/ or peptide treated cells are investigated in comparison to untreated cells.

Example 7: Ligand binding assays

Ligand binding assays provide a direct method for ascertaining receptor pharmacology and are adaptable to a high throughput format. The purified ligand for a receptor is radiolabeled to high specific activity (50-2000 Ci/mmol) for binding studies. A determination is then made that the process of radiolabeling does not diminish the activity of the ligand towards its receptor. Assay conditions for buffers, ions, pH and other modulators such as nucleotides are optimized to establish a workable signal to noise ratio for both membrane and whole cell receptor sources. For these assays, specific receptor binding is defined as total associated radioactivity minus the radioactivity measured in the presence of an excess of unlabeled competing ligand. Where possible, more than one competing ligand is used to define residual nonspecific binding.

mGRR1a, mGRR1b and mGRR2 may have the essentially the same ligands.

WO 03/018798

PCT/EP02/09518

- 41 -

Example 8: Chromosomal localization

The chromosomal localization is inferred using public domain databases, for example ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/>) using conventional techniques. The human mGRR maps on human Chr 10p11.2-p12.; the mGRR2 gene locus maps on human Chr 17q11.1.

Claims

1. An isolated mGRR polypeptide selected from one of the groups consisting of:

- (a) an isolated mGRR polypeptide encoded by a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5;
- (b) an isolated mGRR polypeptide comprising a polypeptide sequence having at least 96% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6 and which shows properties in the ligand binding assay similar to those of mGRR;
- (c) an isolated mGRR1b or mGRR2 polypeptide comprising the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6;
- (d) an isolated mGRR polypeptide having at least 96% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6 and which shows properties in the ligand binding assay similar to those of mGRR;
- (e) the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6;
- (f) an isolated mGRR polypeptide having or comprising a polypeptide sequence that has an Identity Index of 0.96 compared to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6 and which shows properties in the ligand binding assay similar to those of mGRR; or
- (g) a fragment or variant of such a polypeptide according to (a) to (f).

2. The isolated polypeptide as claimed in claim 1 which is the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6.

3. An isolated mGRR polynucleotide selected from one of the groups consisting of:

- (a) an isolated mGRR polynucleotide comprising a polynucleotide sequence having at least 80% identity to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 and which encodes for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR;
- (b) an isolated polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5;
- (c) an isolated polynucleotide comprising at least 96% identity to the polynucleotide of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 and which encodes for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR;
- (d) the isolated polynucleotide of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5;
- (e) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 96% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID

- NO: 4 or SEQ ID NO: 6 and which encodes for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR;
- (f) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5;
- (g) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence having at least 96% identity to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6 and which encodes for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR;
- (h) an isolated polynucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6;
- (i) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence that has an Identity Index of 0.96 compared to the polynucleotide sequence of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5 and which encodes for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR; or
- k) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding a polypeptide sequence that has an Identity Index of 0.96 compared to the polypeptide sequence of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6 and which encode for polypeptides which show properties in the ligand binding assay similar to mGRR; or polynucleotides that are fragments or variants of the above mentioned polynucleotides or that are complementary to above mentioned polynucleotides, over the entire length thereof.
4. An isolated polynucleotide as claimed in claim 3 selected from the group consisting of:
- (a) an isolated polynucleotide comprising the polynucleotide of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5;
- (b) the isolated polynucleotide of SEQ ID NO: 3 or SEQ ID NO: 5;
- (c) an isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence encoding the polypeptide of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6; and
- (d) an isolated polynucleotide encoding the polypeptide of SEQ ID NO: 4 or SEQ ID NO: 6.
5. An expression system comprising a polynucleotide capable of producing a polypeptide of claim 1 when said expression vector is present in a compatible host cell.
6. A recombinant host cell comprising the expression vector of claim 5 or a membrane thereof expressing the polypeptide of claim 1.

7. A process for producing a polypeptide of claim 1 comprising the step of culturing a host cell as defined in claim 6 under conditions sufficient for the production of said polypeptide and recovering the polypeptide from the culture medium.
8. A fusion protein consisting of the immunoglobulin Fc-region and any one polypeptide of claim 1.
9. An antibody immunospecific for the polypeptide of any one of claims 1 to 2.
10. A method of screening to identify compounds that stimulate or inhibit the function or level of the polypeptide of claim 1, comprising a method selected from the group consisting of:
- (a) measuring or, detecting, quantitatively or qualitatively, the binding of a candidate compound to the polypeptide (or to the cells or membranes expressing the polypeptide) or a fusion protein thereof by means of a label directly or indirectly associated with the candidate compound;
 - (b) measuring the competition of binding of a candidate compound to the polypeptide (or to the cells or membranes expressing the polypeptide) or a fusion protein thereof in the presence of a labelled competitor;
 - (c) testing whether the candidate compound results in a signal generated by activation or inhibition of the polypeptide, using detection systems appropriate to the cells or cell membranes expressing the polypeptide;
 - (d) mixing a candidate compound with a solution containing a polypeptide of claim 1, to form a mixture, measuring activity of the polypeptide in the mixture, and comparing the activity of the mixture to a control mixture which contains no candidate compound; or
 - (e) detecting the effect of a candidate compound on the production of mRNA encoding said polypeptide or said polypeptide in cells, using for instance, an ELISA assay, and
 - (f) producing said compound according to biotechnological or chemical standard techniques.

WO 03/018798

1/91

PCT/EP02/09518

SEQUENCE LISTING

<110> Novartis AG

<120> Novel Receptor Proteins

<130> 4-32107A

<150> US 60/315111

<151> 2001-08-27

<160> 34

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3660

<212> DNA

WO 03/018798

2/91

PCT/EP02/09518

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3636)

<223> human mGRR1a

<400> 1

atg gct tac ccc tta ctc ctc tgc ctc ctg ctt gct cag ctg gga ttg 48
 Met Ala Tyr Pro Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Gln Leu Gly Leu
 1 5 10 15

gga gct gtt ggc gcc agc cgc gac ccc caa gga cgg ccg gat tcc cct 96
 Gly Ala Val Gly Ala Ser Arg Asp Pro Gln Gly Arg Pro Asp Ser Pro
 20 25 30

cga gag agg acc ccg aag ggg aag ccg cac gcc cag cag ccg ggt cga 144
 Arg Glu Arg Thr Pro Lys Gly Lys Pro His Ala Gln Gln Pro Gly Arg
 35 40 45

gcc tct gcc tcg gac tcc tcg gct ccc tgg agc cgc tcc acc gat gcc 192
 Ala Ser Ala Ser Asp Ser Ser Ala Pro Trp Ser Arg Ser Thr Asp Gly
 50 55 60

acc atc ttg gcg cag aaa ctc gcc gag gag gtg ccc atg gac gtg gcc 240
 Thr Ile Leu Ala Gln Lys Leu Ala Glu Glu Val Pro Met Asp Val Ala
 65 70 75 80

tct tac ctc tac acc ggg gac tcc cac cag ctg aag cga gcc aac tgc 288
 Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Asp Ser His Gln Leu Lys Arg Ala Asn Cys

WO 03/018798

3/91

PCT/EP02/09518

	85	90	95	
tcc ggc cgc tac gag ttg gcg ggc ctg cgg ggg aag tgg cca gcc ctg				336
Ser Gly Arg Tyr Glu Leu Ala Gly Leu Pro Gly Lys Trp Pro Ala Leu				
	100	105	110	
gcc agc gcg cac ccc tcc ttg cac cgg gcg ctg gac aca ctg aca cac				384
Ala Ser Ala His Pro Ser Leu His Arg Ala Leu Asp Thr Leu Thr His				
	115	120	125	
gcc acc aac ttc ctc aac gtg atg ctg cag agc aat aag tgg cgg gag				432
Ala Thr Asn Phe Leu Asn Val Met Leu Gln Ser Asn Lys Ser Arg Glu				
	130	135	140	
cag aac ttg cag gac gac ctg gat tgg tac cag gcg ctg gtg tgg agc				480
Gln Asn Leu Gln Asp Asp Leu Asp Trp Tyr Gln Ala Leu Val Trp Ser				
	145	150	155	160
ctt ctg gag ggc gag ccc agc atc tcc cgg gcg gcc atc acc ttc agc				528
Leu Leu Glu Gly Glu Pro Ser Ile Ser Arg Ala Ala Ile Thr Phe Ser				
	165	170	175	
acc gat tgg ctg tcc gca cgg gcc cca cag gtc ttc ctc cag gcc acg				576
Thr Asp Ser Leu Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Phe Leu Gln Ala Thr				
	180	185	190	
cgc gag gag agc cgc atc ctg ctc caa gac ctg tcc tcc tcc gca ccc				624
Arg Glu Glu Ser Arg Ile Leu Leu Gln Asp Leu Ser Ser Ser Ala Pro				
	195	200	205	
cac ctg gcc aac gcc act ctg gag acc gag tgg ttc cac ggc ctc cgg				672
His Leu Ala Asn Ala Thr Leu Glu Thr Glu Trp Phe His Gly Leu Arg				
	210	215	220	
cgc aag tgg agg ccc cac tta cac cgc cgc ggc ccc aat cag ggg ccc				720
Arg Lys Trp Arg Pro His Leu His Arg Arg Gly Pro Asn Gln Gly Pro				
	225	230	235	240

WO 03/018798

4/91

PCT/EP02/09518

<p> cgg ggc ctg ggc cac agc tgg cgg cgc aag gac ggg ctc ggc ggg gac Arg Gly Leu Gly His Ser Trp Arg Arg Lys Asp Gly Leu Gly Gly Asp 245 250 255 </p>	768
<p> aag agc cac ttc aag tgg tct ccg cct tat ctg gag tgc gag aac ggg Lys Ser His Phe Lys Trp Ser Pro Pro Tyr Leu Glu Cys Glu Asn Gly 260 265 270 </p>	816
<p> agt tac aag ccc ggg tgg ctg gtt act ctt tcc tct gcc atc tac ggg Ser Tyr Lys Pro Gly Trp Leu Val Thr Leu Ser Ser Ala Ile Tyr Gly 275 280 285 </p>	864
<p> ttg cag cct aac ctg gtc ccg gaa ttc agg ggt gtc atg aaa gtt gac Leu Gln Pro Asn Leu Val Pro Glu Phe Arg Gly Val Met Lys Val Asp 290 295 300 </p>	912
<p> ata aat ctt cag aaa gtg gac att gac caa tgc tca agt gat ggc tgg Ile Asn Leu Gln Lys Val Asp Ile Asp Gln Cys Ser Ser Asp Gly Trp 305 310 315 320 </p>	960
<p> ttt tca gga act cat aaa tgc cac ctc aac aat tca gag tgt atg cca Phe Ser Gly Thr His Lys Cys His Leu Asn Asn Ser Glu Cys Met Pro 325 330 335 </p>	1008
<p> att aaa ggc cta gga ttc gtt ctt gga gcc tat gag tgc att tgc aaa Ile Lys Gly Leu Gly Phe Val Leu Gly Ala Tyr Glu Cys Ile Cys Lys 340 345 350 </p>	1056
<p> gca gga ttc tat cat cct gga gtc tta cca gtg aac aac ttt cgg aga Ala Gly Phe Tyr His Pro Gly Val Leu Pro Val Asn Asn Phe Arg Arg 355 360 365 </p>	1104
<p> agg ggt ccg gat cag cat att tca gga agt aca aaa gat gtg tca gaa Arg Gly Pro Asp Gln His Ile Ser Gly Ser Thr Lys Asp Val Ser Glu 370 375 380 </p>	1152

WO 03/018798

5/91

PCT/EP02/09518

gaa gcc tat gtc tgc cta cct tgc agg gag ggc tgc ccc ttc tgt gct	1200
Glu Ala Tyr Val Cys Leu Pro Cys Arg Glu Gly Cys Pro Phe Cys Ala	
385 390 395 400	
gat gac agc cca tgc ttc gtc cag gaa gat aag tat tta cga ctt gcc	1248
Asp Asp Ser Pro Cys Phe Val Gln Glu Asp Lys Tyr Leu Arg Leu Ala	
405 410 415	
atc atc tcc ttc caa gcc ctg tgt atg ctg ctc gac ttc gtt agc atg	1296
Ile Ile Ser Phe Gln Ala Leu Cys Met Leu Leu Asp Phe Val Ser Met	
420 425 430	
ctg gtg gtc tac cac ttt cgc aaa gca aag agc atc cgg gca tog ggc	1344
Leu Val Val Tyr His Phe Arg Lys Ala Lys Ser Ile Arg Ala Ser Gly	
435 440 445	
ctt atc ctg ttg gaa acg atc ctt ttt gga tct ctg ctc cta tac ttt	1392
Leu Ile Leu Leu Glu Thr Ile Leu Phe Gly Ser Leu Leu Leu Tyr Phe	
450 455 460	
cca gtt gtt att ttg tac ttt gag cca agc aca ttt cgc tgt att ctc	1440
Pro Val Val Ile Leu Tyr Phe Glu Pro Ser Thr Phe Arg Cys Ile Leu	
465 470 475 480	
cta aga tgg gct cgt ctt ctc ggt ttt gct act gtt tac gga act gtc	1488
Leu Arg Trp Ala Arg Leu Leu Gly Phe Ala Thr Val Tyr Gly Thr Val	
485 490 495	
act ctc aaa ctt cac agg gtt ttg aag gtg ttt ctt tca cga acg gct	1536
Thr Leu Lys Leu His Arg Val Leu Lys Val Phe Leu Ser Arg Thr Ala	
500 505 510	
caa cga att cca tat atg act ggc gga cgg gtc atg agg atg ctg gca	1584
Gln Arg Ile Pro Tyr Met Thr Gly Gly Arg Val Met Arg Met Leu Ala	
515 520 525	
gta ata ctc ttg gta gtg ttt tgg ttt ctc att ggc tgg act tca tct	1632

WO 03/018798

6/91

PCT/EP02/09518

Val Ile Leu Leu Val Val Phe Trp Phe Leu Ile Gly Trp Thr Ser Ser	
530	540
gtg tgc cag aat ttg gag aaa cag att tca ctt att ggc cag ggg aaa	1680
Val Cys Gln Asn Leu Glu Lys Gln Ile Ser Leu Ile Gly Gln Gly Lys	
545	550 555 560
aca tcc gat cac ctc atc ttc aat atg tgc ctc att gac cgc tgg gac	1728
Thr Ser Asp His Leu Ile Phe Asn Met Cys Leu Ile Asp Arg Trp Asp	
	565 570 575
tac atg aca gca gtt gct gaa ttt tta ttc ctc ttg tgg ggt gtt tat	1776
Tyr Met Thr Ala Val Ala Glu Phe Leu Phe Leu Leu Trp Gly Val Tyr	
	580 585 590
ctc tgc tat gca gtg cgg aca gtc cca tcg gca ttc cat gag ccc cgc	1824
Leu Cys Tyr Ala Val Arg Thr Val Pro Ser Ala Phe His Glu Pro Arg	
	595 600 605
tat atg gct gtt gca gtt cac aat gag ctc atc atc tct gct ata ttc	1872
Tyr Met Ala Val Ala Val His Asn Glu Leu Ile Ile Ser Ala Ile Phe	
	610 615 620
cat aca att aga ttt gtt ctt gcc tca aga ctt cag tct gat tgg atg	1920
His Thr Ile Arg Phe Val Leu Ala Ser Arg Leu Gln Ser Asp Trp Met	
	625 630 635 640
ttg atg ctg tat ttt gca cat act cat ttg act gtg aca gtc acc att	1968
Leu Met Leu Tyr Phe Ala His Thr His Leu Thr Val Thr Val Thr Ile	
	645 650 655
ggg ttg ctt ttg att cca aag ttt tca cat tca agc aat aac cca cga	2016
Gly Leu Leu Leu Ile Pro Lys Phe Ser His Ser Ser Asn Asn Pro Arg	
	660 665 670
gat gat att gct aca gaa gca tat gag gat gag cta gac atg ggc cga	2064
Asp Asp Ile Ala Thr Glu Ala Tyr Glu Asp Glu Leu Asp Met Gly Arg	

WO 03/018798

7/91

PCT/EP02/09518

675	680	685	
tct gga tcc tac ctg aac agc agt atc aat tca gcc tgg agt gag cac			2112
Ser Gly Ser Tyr Leu Asn Ser Ser Ile Asn Ser Ala Trp Ser Glu His			
690	695	700	
agc ttg gat cca gag gac att cgg gac gag ctg aaa aaa ctc tat gcc			2160
Ser Leu Asp Pro Glu Asp Ile Arg Asp Glu Leu Lys Lys Leu Tyr Ala			
705	710	715	720
caa ctg gaa ata tat aaa aga aag aag atg atc aca aac aac ccc cac			2208
Gln Leu Glu Ile Tyr Lys Arg Lys Lys Met Ile Thr Asn Asn Pro His			
725	730	735	
ctc cag aaa aag cgg tgc tgc aag aag ggc cta ggt cgt tcc atc atg			2256
Leu Gln Lys Lys Arg Cys Ser Lys Lys Gly Leu Gly Arg Ser Ile Met			
740	745	750	
aga cgc att acg gag atc cca gag aca gtc agc cgg cag tgc cct aaa			2304
Arg Arg Ile Thr Glu Ile Pro Glu Thr Val Ser Arg Gln Cys Pro Lys			
755	760	765	
gag gac aag gag ggc gcc gac cat ggc aca gcc aaa ggc act gcc ctc			2352
Glu Asp Lys Glu Gly Ala Asp His Gly Thr Ala Lys Gly Thr Ala Leu			
770	775	780	
atc agg aag aac ccc cca gag tct tca ggg aac aca ggg aaa tcc aag			2400
Ile Arg Lys Asn Pro Pro Glu Ser Ser Gly Asn Thr Gly Lys Ser Lys			
785	790	795	800
gag gag acc ctg aaa aac cga gtc ttc tca ctc aag aaa tcc cac agc			2448
Glu Glu Thr Leu Lys Asn Arg Val Phe Ser Leu Lys Lys Ser His Ser			
805	810	815	
act tat gac cac gtg aga gac caa acg gaa gag tcc agt agc cta ccc			2496
Thr Tyr Asp His Val Arg Asp Gln Thr Glu Glu Ser Ser Ser Leu Pro			
820	825	830	

WO 03/018798

8/91

PCT/EP02/09518

aca gaa agc caa gag gag gag aca aca gaa aat tcc aca ctg gaa tcc	2544
Thr Glu Ser Gln Glu Glu Thr Thr Glu Asn Ser Thr Leu Glu Ser	
835 840 845	
ctg tcg ggt aaa aaa cta aca caa aaa cta aaa gaa gac agc gag gct	2592
Leu Ser Gly Lys Lys Leu Thr Gln Lys Leu Lys Glu Asp Ser Glu Ala	
850 855 860	
gag tcc acg gag tcg gtg ccg ttg gtg tgc aag tca gca agc gct cac	2640
Glu Ser Thr Glu Ser Val Pro Leu Val Cys Lys Ser Ala Ser Ala His	
865 870 875 880	
aac ctc agc tca gag aag aaa act ggg cac cca cga aca tcg atg tta	2688
Asn Leu Ser Ser Glu Lys Lys Thr Gly His Pro Arg Thr Ser Met Leu	
885 890 895	
cag aag tct ctc agt gtc ata gca agc gcc aag gag aag act ctt gga	2736
Gln Lys Ser Leu Ser Val Ile Ala Ser Ala Lys Glu Lys Thr Leu Gly	
900 905 910	
tta gct ggg aaa acc caa aca gca ggt gtg gaa gaa cgc act aaa tcc	2784
Leu Ala Gly Lys Thr Gln Thr Ala Gly Val Glu Glu Arg Thr Lys Ser	
915 920 925	
cag aaa cct ttg cca aaa gat aaa gag aca aac aga aat cac tca aat	2832
Gln Lys Pro Leu Pro Lys Asp Lys Glu Thr Asn Arg Asn His Ser Asn	
930 935 940	
tct gat aac aca gag act aaa gat cct gcc ccc caa aac tca aat cct	2880
Ser Asp Asn Thr Glu Thr Lys Asp Pro Ala Pro Gln Asn Ser Asn Pro	
945 950 955 960	
gcg gag gag cca aga aag cct cag aaa tct ggg att atg aaa caa caa	2928
Ala Glu Glu Pro Arg Lys Pro Gln Lys Ser Gly Ile Met Lys Gln Gln	
965 970 975	

WO 03/018798

9/91

PCT/EP02/09518

agg gtc aac ccc acc act gcc aat tct gac ctg aac cca ggc acc acc	2976
Arg Val Asn Pro Thr Thr Ala Asn Ser Asp Leu Asn Pro Gly Thr Thr	
980 985 990	
cag atg aag gac aac ttt gac att ggg gag gtg tgt cct tgg gag gtt	3024
Gln Met Lys Asp Asn Phe Asp Ile Gly Glu Val Cys Pro Trp Glu Val	
995 1000 1005	
tat gac ctg acc cct ggt cct gtg cct tca gaa tca aaa gtt caa	3069
Tyr Asp Leu Thr Pro Gly Pro Val Pro Ser Glu Ser Lys Val Gln	
1010 1015 1020	
aag cac gta tct att gtg gct tct gaa atg gag aaa aac ccc act	3114
Lys His Val Ser Ile Val Ala Ser Glu Met Glu Lys Asn Pro Thr	
1025 1030 1035	
ttt tcc tta aag gag aaa tct cac cac aag cct aag gca gct gag	3159
Phe Ser Leu Lys Glu Lys Ser His His Lys Pro Lys Ala Ala Glu	
1040 1045 1050	
gtt tgt cag caa tcc aat cag aag cgc ata gat aag gct gaa gta	3204
Val Cys Gln Gln Ser Asn Gln Lys Arg Ile Asp Lys Ala Glu Val	
1055 1060 1065	
tgc ctt tgg gag agc caa ggc cag tcc att ttg gaa gat gag aag	3249
Cys Leu Trp Glu Ser Gln Gly Gln Ser Ile Leu Glu Asp Glu Lys	
1070 1075 1080	
ctt ttg att tcc aag act cca gtt ctc cca gag agg gca aaa gag	3294
Leu Leu Ile Ser Lys Thr Pro Val Leu Pro Glu Arg Ala Lys Glu	
1085 1090 1095	
gag aac gga ggt cag cct cgt gca gcc aat gtg tgt gct ggg cag	3339
Glu Asn Gly Gly Gln Pro Arg Ala Ala Asn Val Cys Ala Gly Gln	
1100 1105 1110	
agc gaa gaa ctg ccc ccc aaa gct gta gca tca aaa aca gag aat	3384

WO 03/018798

10/91

PCT/EP02/09518

Ser Glu	Glu Leu Pro Pro Lys	Ala Val Ala Ser Lys	Thr Glu Asn	
1115		1120	1125	
gaa aat ctc aac caa ata gga cac cag gaa aaa aag aca tct tct 3429				
Glu Asn	Leu Asn Gln Ile Gly	His Gln Glu Lys Lys	Thr Ser Ser	
1130		1135	1140	
tct gag gag aat gtg cgt ggc tcc tat aac tca agt aat aac ttc 3474				
Ser Glu	Glu Asn Val Arg Gly	Ser Tyr Asn Ser Ser	Asn Asn Phe	
1145		1150	1155	
cag caa cct tta aca tca cga gca gag gtt tgt cct tgg gag ttt 3519				
Glu Gln	Pro Leu Thr Ser Arg	Ala Glu Val Cys Pro	Trp Glu Phe	
1160		1165	1170	
gag acc cca gct caa cca aat gct gga aga agt gta gct tta cct 3564				
Glu Thr	Pro Ala Gln Pro Asn	Ala Gly Arg Ser Val	Ala Leu Pro	
1175		1180	1185	
gcc tct tot gct cta agt gca aat aag ata gca ggg cct agg aaa 3609				
Ala Ser	Ser Ala Leu Ser Ala	Asn Lys Ile Ala Gly	Pro Arg Lys	
1190		1195	1200	
gaa gag atc tgg gat agt ttt aaa gtg tagcatctcc aggaagaaga ggaa 3660				
Glu Glu	Ile Trp Asp Ser Phe	Lys Val		
1205		1210		

<210> 2

<211> 1212

<212> PRT

<213> Homo sapiens

WO 03/018798

11/91

PCT/EP02/09518

<400> 2

Met Ala Tyr Pro Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Gln Leu Gly Leu
 1 5 10 15

Gly Ala Val Gly Ala Ser Arg Asp Pro Gln Gly Arg Pro Asp Ser Pro
 20 25 30

Arg Glu Arg Thr Pro Lys Gly Lys Pro His Ala Gln Gln Pro Gly Arg
 35 40 45

Ala Ser Ala Ser Asp Ser Ser Ala Pro Trp Ser Arg Ser Thr Asp Gly
 50 55 60

Thr Ile Leu Ala Gln Lys Leu Ala Glu Glu Val Pro Met Asp Val Ala
 65 70 75 80

Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Asp Ser His Gln Leu Lys Arg Ala Asn Cys
 85 90 95

Ser Gly Arg Tyr Glu Leu Ala Gly Leu Pro Gly Lys Trp Pro Ala Leu
 100 105 110

Ala Ser Ala His Pro Ser Leu His Arg Ala Leu Asp Thr Leu Thr His
 115 120 125

Ala Thr Asn Phe Leu Asn Val Met Leu Gln Ser Asn Lys Ser Arg Glu

WO 03/018798

13/91

PCT/EP02/09518

Leu Gln Pro Asn Leu Val Pro Glu Phe Arg Gly Val Met Lys Val Asp
290 295 300

Ile Asn Leu Gln Lys Val Asp Ile Asp Gln Cys Ser Ser Asp Gly Trp
305 310 315 320

Phe Ser Gly Thr His Lys Cys His Leu Asn Asn Ser Glu Cys Met Pro
325 330 335

Ile Lys Gly Leu Gly Phe Val Leu Gly Ala Tyr Glu Cys Ile Cys Lys
340 345 350

Ala Gly Phe Tyr His Pro Gly Val Leu Pro Val Asn Asn Phe Arg Arg
355 360 365

Arg Gly Pro Asp Gln His Ile Ser Gly Ser Thr Lys Asp Val Ser Glu
370 375 380

Glu Ala Tyr Val Cys Leu Pro Cys Arg Glu Gly Cys Pro Phe Cys Ala
385 390 395 400

Asp Asp Ser Pro Cys Phe Val Gln Glu Asp Lys Tyr Leu Arg Leu Ala
405 410 415

Ile Ile Ser Phe Gln Ala Leu Cys Met Leu Leu Asp Phe Val Ser Met
420 425 430

WO 03/018798

14/91

PCT/EP02/09518

Leu Val Val Tyr His Phe Arg Lys Ala Lys Ser Ile Arg Ala Ser Gly
435 440 445

Leu Ile Leu Leu Glu Thr Ile Leu Phe Gly Ser Leu Leu Leu Tyr Phe
450 455 460

Pro Val Val Ile Leu Tyr Phe Glu Pro Ser Thr Phe Arg Cys Ile Leu
465 470 475 480

Leu Arg Trp Ala Arg Leu Leu Gly Phe Ala Thr Val Tyr Gly Thr Val
485 490 495

Thr Leu Lys Leu His Arg Val Leu Lys Val Phe Leu Ser Arg Thr Ala
500 505 510

Gln Arg Ile Pro Tyr Met Thr Gly Gly Arg Val Met Arg Met Leu Ala
515 520 525

Val Ile Leu Leu Val Val Phe Trp Phe Leu Ile Gly Trp Thr Ser Ser
530 535 540

Val Cys Gln Asn Leu Glu Lys Gln Ile Ser Leu Ile Gly Gln Gly Lys
545 550 555 560

Thr Ser Asp His Leu Ile Phe Asn Met Cys Leu Ile Asp Arg Trp Asp
565 570 575

WO 03/018798

15/91

PCT/EP02/09518

Tyr Met Thr Ala Val Ala Glu Phe Leu Phe Leu Leu Trp Gly Val Tyr
580 585 590

Leu Cys Tyr Ala Val Arg Thr Val Pro Ser Ala Phe His Glu Pro Arg
595 600 605

Tyr Met Ala Val Ala Val His Asn Glu Leu Ile Ile Ser Ala Ile Phe
610 615 620

His Thr Ile Arg Phe Val Leu Ala Ser Arg Leu Gln Ser Asp Trp Met
625 630 635 640

Leu Met Leu Tyr Phe Ala His Thr His Leu Thr Val Thr Val Thr Ile
645 650 655

Gly Leu Leu Leu Ile Pro Lys Phe Ser His Ser Ser Asn Asn Pro Arg
660 665 670

Asp Asp Ile Ala Thr Glu Ala Tyr Glu Asp Glu Leu Asp Met Gly Arg
675 680 685

Ser Gly Ser Tyr Leu Asn Ser Ser Ile Asn Ser Ala Trp Ser Glu His
690 695 700

Ser Leu Asp Pro Glu Asp Ile Arg Asp Glu Leu Lys Lys Leu Tyr Ala
705 710 715 720

Gln Leu Glu Ile Tyr Lys Arg Lys Lys Met Ile Thr Asn Asn Pro His

WO 03/018798

16/91

PCT/EP02/09518

725

730

735

Leu Gln Lys Lys Arg Cys Ser Lys Lys Gly Leu Gly Arg Ser Ile Met
 740 745 750

Arg Arg Ile Thr Glu Ile Pro Glu Thr Val Ser Arg Gln Cys Pro Lys
 755 760 765

Glu Asp Lys Glu Gly Ala Asp His Gly Thr Ala Lys Gly Thr Ala Leu
 770 775 780

Ile Arg Lys Asn Pro Pro Glu Ser Ser Gly Asn Thr Gly Lys Ser Lys
 785 790 795 800

Glu Glu Thr Leu Lys Asn Arg Val Phe Ser Leu Lys Lys Ser His Ser
 805 810 815

Thr Tyr Asp His Val Arg Asp Gln Thr Glu Glu Ser Ser Ser Leu Pro
 820 825 830

Thr Glu Ser Gln Glu Glu Glu Thr Thr Glu Asn Ser Thr Leu Glu Ser
 835 840 845

Leu Ser Gly Lys Lys Leu Thr Gln Lys Leu Lys Glu Asp Ser Glu Ala
 850 855 860

Glu Ser Thr Glu Ser Val Pro Leu Val Cys Lys Ser Ala Ser Ala His
 865 870 875 880

WO 03/018798

17/91

PCT/EP02/09518

Asn Leu Ser Ser Glu Lys Lys Thr Gly His Pro Arg Thr Ser Met Leu
885 890 895

Gln Lys Ser Leu Ser Val Ile Ala Ser Ala Lys Glu Lys Thr Leu Gly
900 905 910

Leu Ala Gly Lys Thr Gln Thr Ala Gly Val Glu Glu Arg Thr Lys Ser
915 920 925

Gln Lys Pro Leu Pro Lys Asp Lys Glu Thr Asn Arg Asn His Ser Asn
930 935 940

Ser Asp Asn Thr Glu Thr Lys Asp Pro Ala Pro Gln Asn Ser Asn Pro
945 950 955 960

Ala Glu Glu Pro Arg Lys Pro Gln Lys Ser Gly Ile Met Lys Gln Gln
965 970 975

Arg Val Asn Pro Thr Thr Ala Asn Ser Asp Leu Asn Pro Gly Thr Thr
980 985 990

Gln Met Lys Asp Asn Phe Asp Ile Gly Glu Val Cys Pro Trp Glu Val
995 1000 1005

Tyr Asp Leu Thr Pro Gly Pro Val Pro Ser Glu Ser Lys Val Gln
1010 1015 1020

WO 03/018798

18/91

PCT/EP02/09518

Lys His Val Ser Ile Val Ala Ser Glu Met Glu Lys Asn Pro Thr
 1025 1030 1035

Phe Ser Leu Lys Glu Lys Ser His His Lys Pro Lys Ala Ala Glu
 1040 1045 1050

Val Cys Gln Cln Ser Asn Gln Lys Arg Ile Asp Lys Ala Glu Val
 1055 1060 1065

Cys Leu Trp Glu Ser Gln Gly Gln Ser Ile Leu Glu Asp Glu Lys
 1070 1075 1080

Leu Leu Ile Ser Lys Thr Pro Val Leu Pro Glu Arg Ala Lys Glu
 1085 1090 1095

Glu Asn Gly Gly Gln Pro Arg Ala Ala Asn Val Cys Ala Gly Gln
 1100 1105 1110

Ser Glu Glu Leu Pro Pro Lys Ala Val Ala Ser Lys Thr Glu Asn
 1115 1120 1125

Glu Asn Leu Asn Gln Ile Gly His Gln Glu Lys Lys Thr Ser Ser
 1130 1135 1140

Ser Glu Glu Asn Val Arg Gly Ser Tyr Asn Ser Ser Asn Asn Phe
 1145 1150 1155

WO 03/018798

19/91

PCT/EP02/09518

Gln Gln Pro Leu Thr Ser Arg Ala Glu Val Cys Pro Trp Glu Phe
1160 1165 1170

Glu Thr Pro Ala Gln Pro Asn Ala Gly Arg Ser Val Ala Leu Pro
1175 1180 1185

Ala Ser Ser Ala Leu Ser Ala Asn Lys Ile Ala Gly Pro Arg Lys
1190 1195 1200

Glu Glu Ile Trp Asp Ser Phe Lys Val
1205 1210

<210> 3

<211> 3563

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (5)..(3553)

<223> human mGRR1b

<400> 3

WO 03/018798

20/91

PCT/EP02/09518

cctc atg ctg gaa gct ctg cta ctc tcc cag tgg gga ctc cgc ttc tca	49
Met Leu Glu Ala Leu Leu Leu Ser Gln Trp Gly Leu Arg Phe Ser	
1 5 10 15	
ttt cct ggg cct tct gtt cat gat tta tgg atg aga cag agg atg atg	97
Phe Pro Gly Pro Ser Val His Asp Leu Trp Met Arg Gln Arg Met Met	
20 25 30	
ttg gct cca tct gga aag tgg gtc agc cag tct ttg agg aga cac ctt	145
Leu Ala Pro Ser Gly Lys Trp Val Ser Gln Ser Leu Arg Arg His Leu	
35 40 45	
gga ggc cta gga ata gtg ctc tac acc ggg gac tcc cac cag ctg aag	193
Gly Gly Leu Gly Ile Val Leu Tyr Thr Gly Asp Ser His Gln Leu Lys	
50 55 60	
cga gcc aac tgc tcc ggc cgc tac gag ttg gcg ggc ctg ccg ggg aag	241
Arg Ala Asn Cys Ser Gly Arg Tyr Glu Leu Ala Gly Leu Pro Gly Lys	
65 70 75	
tgg cca gcc ctg gcc agc gcg cac ccc tcc ttg cac cgg gcg ctg gac	289
Trp Pro Ala Leu Ala Ser Ala His Pro Ser Leu His Arg Ala Leu Asp	
80 85 90 95	
aca ctg aca cac gcc acc aac ttc ctc aac gtg atg ctg cag agc aat	337
Thr Leu Thr His Ala Thr Asn Phe Leu Asn Val Met Leu Gln Ser Asn	
100 105 110	
aag tgg cgg gag cag aac ttg cag gac gac ctg gat tgg tac cag gcg	385
Lys Ser Arg Glu Gln Asn Leu Gln Asp Asp Leu Asp Trp Tyr Gln Ala	
115 120 125	
ctg gtg tgg agc ctt ctg gag ggc gag ccc agc atc tcc cgg gcg gcc	433
Leu Val Trp Ser Leu Leu Glu Gly Glu Pro Ser Ile Ser Arg Ala Ala	
130 135 140	
atc acc ttc agc acc gat tgg ctg tcc gca cgg gcc cca cag gtc ttc	481

WO 03/018798

21/91

PCT/EP02/09518

Ile Thr Phe Ser Thr Asp Ser Leu Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Phe	
145	150 155
ctc cag gcc acg cgc gag gag agc cgc atc ctg ctc caa gac ctg tcc	529
Leu Gln Ala Thr Arg Glu Glu Ser Arg Ile Leu Leu Gln Asp Leu Ser	
160	165 170 175
tcc tcc gca ccc cac ctg gcc aac gcc act ctg gag acc gag tgg ttc	577
Ser Ser Ala Pro His Leu Ala Asn Ala Thr Leu Glu Thr Glu Trp Phe	
	180 185 190
cac gcc ctc cgg cgc aag tgg agg ccc cac tta cac cgc cgc gcc ccc	625
His Gly Leu Arg Arg Lys Trp Arg Pro His Leu His Arg Arg Gly Pro	
	195 200 205
aat cag ggg ccc cgg gcc ctg gcc cac agc tgg cgg cgc aag gac ggg	673
Asn Gln Gly Pro Arg Gly Leu Gly His Ser Trp Arg Arg Lys Asp Gly	
	210 215 220
ctc gcc ggg gac aag agc cac ttc aag tgg tct ccg cct tat ctg gag	721
Leu Gly Gly Asp Lys Ser His Phe Lys Trp Ser Pro Pro Tyr Leu Glu	
	225 230 235
tgc gag aac ggg agt tac aag ccc ggg tgg ctg gtt act ctt tcc tct	769
Cys Glu Asn Gly Ser Tyr Lys Pro Gly Trp Leu Val Thr Leu Ser Ser	
	240 245 250 255
gcc atc tac ggg ttg cag cct aac ctg gtc ccg gaa ttc agg ggt gtc	817
Ala Ile Tyr Gly Leu Gln Pro Asn Leu Val Pro Glu Phe Arg Gly Val	
	260 265 270
atg aaa gtt gac ata aat ctt cag aaa gtg gac att gac caa tgc tca	865
Met Lys Val Asp Ile Asn Leu Gln Lys Val Asp Ile Asp Gln Cys Ser	
	275 280 285
agt gat gcc tgg ttt tca gga act cat aaa tgc cac ctc aac aat tca	913
Ser Asp Gly Trp Phe Ser Gly Thr His Lys Cys His Leu Asn Asn Ser	

WO 03/018798

22/91

PCT/EP02/09518

290	295	300	
gag tgt atg cca att aaa ggc cta gga ttc gtt ctt gga gcc tat gag			961
Glu Cys Met Pro Ile Lys Gly Leu Gly Phe Val Leu Gly Ala Tyr Glu			
305	310	315	
tgc att tgc aaa gca gga ttc tat cat cct gga gtc tta cca gtg aac			1009
Cys Ile Cys Lys Ala Gly Phe Tyr His Pro Gly Val Leu Pro Val Asn			
320	325	330	335
aac ttt cgg aga agg ggt ccg gat cag cat att tca gga agt aca aaa			1057
Asn Phe Arg Arg Arg Gly Pro Asp Gln His Ile Ser Gly Ser Thr Lys			
340	345	350	
gat gtg tca gaa gaa gcc tat gtc tgc cta cct tgc agg gag ggc tgc			1105
Asp Val Ser Glu Glu Ala Tyr Val Cys Leu Pro Cys Arg Glu Gly Cys			
355	360	365	
ccc ttc tgt gct gat gac agc cca tgc ttc gtc cag gaa gat aag tat			1153
Pro Phe Cys Ala Asp Asp Ser Pro Cys Phe Val Gln Glu Asp Lys Tyr			
370	375	380	
tta cga ctt gcc atc atc tcc ttc caa gcc ctg tgt atg ctg ctc gac			1201
Leu Arg Leu Ala Ile Ile Ser Phe Gln Ala Leu Cys Met Leu Leu Asp			
385	390	395	
ttc gtt agc atg ctg gtg gtc tac cac ttt cgc aaa gca aag agc atc			1249
Phe Val Ser Met Leu Val Val Tyr His Phe Arg Lys Ala Lys Ser Ile			
400	405	410	415
cgg gca tcy ggc ctt atc ctg ttg gaa acg atc ctt ttt gga tct ctg			1297
Arg Ala Ser Gly Leu Ile Leu Leu Glu Thr Ile Leu Phe Gly Ser Leu			
420	425	430	
ctc cta tac ttt cca gtt gtt att ttg tac ttt gag cca agc aca ttt			1345
Leu Leu Tyr Phe Pro Val Val Ile Leu Tyr Phe Glu Pro Ser Thr Phe			
435	440	445	

WO 03/018798

23/91

PCT/EP02/09518

<p> cgc tgt att ctc cta aga tgg gct cgt ctt ctc ggt ttt gct act gtt Arg Cys Ile Leu Leu Arg Trp Ala Arg Leu Leu Gly Phe Ala Thr Val 450 455 460 </p>	1393
<p> tac gga act gtc act ctc aaa ctt cac agg gtt ttg aag gtg ttt ctt Tyr Gly Thr Val Thr Leu Lys Leu His Arg Val Leu Lys Val Phe Leu 465 470 475 </p>	1441
<p> tca cga acg gct caa cga att cca tat atg act ggc gga cgg gtc atg Ser Arg Thr Ala Gln Arg Ile Pro Tyr Met Thr Gly Gly Arg Val Met 480 485 490 495 </p>	1489
<p> agg atg ctg gca gta ata ctc ttg gta gtg ttt tgg ttt ctc att ggc Arg Met Leu Ala Val Ile Leu Leu Val Val Phe Trp Phe Leu Ile Gly 500 505 510 </p>	1537
<p> tgg act tca tct gtg tgc cag aat ttg gag aaa cag att tca ctt att Trp Thr Ser Ser Val Cys Gln Asn Leu Glu Lys Gln Ile Ser Leu Ile 515 520 525 </p>	1585
<p> ggc cag ggg aaa aca tcc gat cac ctc atc ttc aat atg tgc ctc att Gly Gln Gly Lys Thr Ser Asp His Leu Ile Phe Asn Met Cys Leu Ile 530 535 540 </p>	1633
<p> gac cgc tgg gac tac atg aca gca gtt gct gaa ttt tta ttc ctc ttg Asp Arg Trp Asp Tyr Met Thr Ala Val Ala Glu Phe Leu Phe Leu Leu 545 550 555 </p>	1681
<p> tgg ggt gtt tat ctc tgc tat gca gtg cgg aca gtc cca tcg gca ttc Trp Gly Val Tyr Leu Cys Tyr Ala Val Arg Thr Val Pro Ser Ala Phe 560 565 570 575 </p>	1729
<p> cat gag ccc cgc tat atg gct gtt gca gtt cac aat gag ctc atc atc His Glu Pro Arg Tyr Met Ala Val Ala Val His Asn Glu Leu Ile Ile 580 585 590 </p>	1777

WO 03/018798

24/91

PCT/EP02/09518

tct gct ata ttc cat aca att aga ttt gtt ctt gcc tca aga ctt cag	1825
Ser Ala Ile Phe His Thr Ile Arg Phe Val Leu Ala Ser Arg Leu Gln	
595 600 605	
tct gat tgg atg ttg atg ctg tat ttt gca cat act cat ttg act gtg	1873
Ser Asp Trp Met Leu Met Leu Tyr Phe Ala His Thr His Leu Thr Val	
610 615 620	
aca gtc acc att ggg ttg ctt ttg att cca aag ttt tca cat tca agc	1921
Thr Val Thr Ile Gly Leu Leu Leu Ile Pro Lys Phe Ser His Ser Ser	
625 630 635	
aat aac cca cga gat gat att gct aca gaa gca tat gag gat gag cta	1969
Asn Asn Pro Arg Asp Asp Ile Ala Thr Glu Ala Tyr Glu Asp Glu Leu	
640 645 650 655	
gac atg ggc cga tct gga tcc tac ctg aac agc agt atc aat tca gcc	2017
Asp Met Gly Arg Ser Gly Ser Tyr Leu Asn Ser Ser Ile Asn Ser Ala	
660 665 670	
tgg agt gag cac agc ttg gat cca gag gac att cgg gac gag ctg aaa	2065
Trp Ser Glu His Ser Leu Asp Pro Glu Asp Ile Arg Asp Glu Leu Lys	
675 680 685	
aaa ctc tat gcc caa ctg gaa ata tat aaa aga aag aag atg atc aca	2113
Lys Leu Tyr Ala Gln Leu Glu Ile Tyr Lys Arg Lys Lys Met Ile Thr	
690 695 700	
aac aac ccc cac ctc cag aaa aag cgg tgc tcg aag aag ggc cta ggt	2161
Asn Asn Pro His Leu Gln Lys Lys Arg Cys Ser Lys Lys Gly Leu Gly	
705 710 715	
cgt tcc atc atg aga cgc att acg gag atc cca gag aca gtc agc cgg	2209
Arg Ser Ile Met Arg Arg Ile Thr Glu Ile Pro Glu Thr Val Ser Arg	
720 725 730 735	
cag tgc cct aaa gag gac aag gag ggc gcc gac cat ggc aca gcc aaa	2257

WO 03/018798

25/91

PCT/EP02/09518

Gln Cys Pro Lys Glu Asp Lys Glu Gly Ala Asp His Gly Thr Ala Lys	
740	745
750	
ggc act gcc ctc atc agg aag aac ccc cca gag tct tca ggg aac aca	2305
Gly Thr Ala Leu Ile Arg Lys Asn Pro Pro Glu Ser Ser Gly Asn Thr	
755	760
765	
ggg aaa tcc aag gag gag acc ctg aaa aac cga gtc ttc tca ctc aag	2353
Gly Lys Ser Lys Glu Glu Thr Leu Lys Asn Arg Val Phe Ser Leu Lys	
770	775
780	
aaa tcc cac agc act tat gac cac gtg aga gac caa acg gaa gag tcc	2401
Lys Ser His Ser Thr Tyr Asp His Val Arg Asp Gln Thr Glu Glu Ser	
785	790
795	
agt agc cta ccc aca gaa agc caa gag gag gag aca aca gaa aat tcc	2449
Ser Ser Leu Pro Thr Glu Ser Gln Glu Glu Glu Thr Thr Glu Asn Ser	
800	805
810	815
aca ctg gaa tcc ctg tcg ggt aaa aaa cta aca caa aaa cta aaa gaa	2497
Thr Leu Glu Ser Leu Ser Gly Lys Lys Leu Thr Gln Lys Leu Lys Glu	
820	825
830	
gac agc gag gct gag tcc acg gag tcg gtg cag ttg gtg tgc aag tca	2545
Asp Ser Glu Ala Glu Ser Thr Glu Ser Val Pro Leu Val Cys Lys Ser	
835	840
845	
gca agc gct cac aac ctc agc tca gag aag aaa act ggg cac cca cga	2593
Ala Ser Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Lys Lys Thr Gly His Pro Arg	
850	855
860	
aca tcg atg tta cag aag tct ctc agt gtc ata gca agc gcc aag gag	2641
Thr Ser Met Leu Gln Lys Ser Leu Ser Val Ile Ala Ser Ala Lys Glu	
865	870
875	
aag act ctt gga tta gct ggg aaa acc caa aca gca ggt gtg gaa gaa	2689
Lys Thr Leu Gly Leu Ala Gly Lys Thr Gln Thr Ala Gly Val Glu Glu	

WO 03/018798	26/91	PCT/EP02/09518		
880	885	890	895	
cgc act aaa tcc cag aaa cct ttg cca aaa gat aaa gag aca aac aga				2737
Arg Thr Lys Ser Gln Lys Pro Leu Pro Lys Asp Lys Glu Thr Asn Arg				
	900	905	910	
aat cac tca aat tct gat aac aca gag act aaa gat cct gcc ccc caa				2785
Asn His Ser Asn Ser Asp Asn Thr Glu Thr Lys Asp Pro Ala Pro Gln				
	915	920	925	
aac tca aat cct gcg gag gag cca aga aag cct cag aaa tct ggg att				2833
Asn Ser Asn Pro Ala Glu Glu Pro Arg Lys Pro Gln Lys Ser Gly Ile				
	930	935	940	
atg aaa caa caa agg gtc aac ccc acc act gcc aat tct gac ctg aac				2881
Met Lys Gln Gln Arg Val Asn Pro Thr Thr Ala Asn Ser Asp Leu Asn				
	945	950	955	
cca ggc acc acc cag atg aag gac aac ttt gac att ggg gag gtg tgt				2929
Pro Gly Thr Thr Gln Met Lys Asp Asn Phe Asp Ile Gly Glu Val Cys				
	960	965	970	975
cct tgg gag gtt tat gac ctg acc cct ggt cct gtg cct tca gaa tca				2977
Pro Trp Glu Val Tyr Asp Leu Thr Pro Gly Pro Val Pro Ser Glu Ser				
	980	985	990	
aaa gtt caa aag cac gta tct att gtg gct tct gaa atg gag aaa aac				3025
Lys Val Gln Lys His Val Ser Ile Val Ala Ser Glu Met Glu Lys Asn				
	995	1000	1005	
ccc act ttt tcc tta aag gag aaa tct cac cac aag cct aag gca				3070
Pro Thr Phe Ser Leu Lys Glu Lys Ser His His Lys Pro Lys Ala				
	1010	1015	1020	
gct gag gtt tgt cag caa tcc aat cag aag cgc ata gat aag gct				3115
Ala Glu Val Cys Gln Gln Ser Asn Gln Lys Arg Ile Asp Lys Ala				
	1025	1030	1035	

WO 03/018798

27/91

PCT/EP02/09518

gaa gta tgc ctt tgg gag agc caa ggc cag tcc att ttg gaa gat	3160
Glu Val Cys Leu Trp Glu Ser Gln Gly Gln Ser Ile Leu Glu Asp	
1040 1045 1050	
gag aag ctt ttg att tcc aag act cca gtt ctc cca gag agg gca	3205
Glu Lys Leu Leu Ile Ser Lys Thr Pro Val Leu Pro Glu Arg Ala	
1055 1060 1065	
aaa gag gag aac gga ggt cag cct cgt gca gcc aat gtg tgt gct	3250
Lys Glu Glu Asn Gly Gly Gln Pro Arg Ala Ala Asn Val Cys Ala	
1070 1075 1080	
ggg cag agc gaa gaa ctg ccc ccc aaa gct gta gca tca aaa aca	3295
Gly Gln Ser Glu Glu Leu Pro Pro Lys Ala Val Ala Ser Lys Thr	
1085 1090 1095	
gag aat gaa aat ctc aac caa ata gga cac cag gaa aaa aag aca	3340
Glu Asn Glu Asn Leu Asn Gln Ile Gly His Gln Glu Lys Lys Thr	
1100 1105 1110	
tct tct tct gag gag aat gtg cgt ggc tcc tat aac tca agt aat	3385
Ser Ser Ser Glu Glu Asn Val Arg Gly Ser Tyr Asn Ser Ser Asn	
1115 1120 1125	
aac ttc cag caa cct tta aca tca cga gca gag gtt tgt cct tgg	3430
Asn Phe Gln Gln Pro Leu Thr Ser Arg Ala Glu Val Cys Pro Trp	
1130 1135 1140	
gag ttt gag acc cca gct caa cca aat gct gga aga agt gta gct	3475
Glu Phe Glu Thr Pro Ala Gln Pro Asn Ala Gly Arg Ser Val Ala	
1145 1150 1155	
tta cct gcc tct tct gct cta agt gca aat aag ata gca ggg cct	3520
Leu Pro Ala Ser Ser Ala Leu Ser Ala Asn Lys Ile Ala Gly Pro	
1160 1165 1170	

WO 03/018798

28/91

PCT/EP02/09518

agg aaa gaa gag atc tgg gat agt ttt aaa gtg tagcatctcc 3563
Arg Lys Glu Glu Ile Trp Asp Ser Phe Lys Val
1175 1180

<210> 4

<211> 1183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Leu Glu Ala Leu Leu Leu Ser Gln Trp Gly Leu Arg Phe Ser Phe
1 5 10 15

Pro Gly Pro Ser Val His Asp Leu Trp Met Arg Gln Arg Met Met Leu
20 25 30

Ala Pro Ser Gly Lys Trp Val Ser Gln Ser Leu Arg Arg His Leu Gly
35 40 45

Gly Leu Gly Ile Val Leu Tyr Thr Gly Asp Ser His Gln Leu Lys Arg
50 55 60

Ala Asn Cys Ser Gly Arg Tyr Glu Leu Ala Gly Leu Pro Gly Lys Trp
65 70 75 80

WO 03/018798

29/91

PCT/EP02/09518

Pro Ala Leu Ala Ser Ala His Pro Ser Leu His Arg Ala Leu Asp Thr
 85 90 95

Leu Thr His Ala Thr Asn Phe Leu Asn Val Met Leu Gln Ser Asn Lys
 100 105 110

Ser Arg Glu Gln Asn Leu Gln Asp Asp Leu Asp Trp Tyr Gln Ala Leu
 115 120 125

Val Trp Ser Leu Leu Glu Gly Glu Pro Ser Ile Ser Arg Ala Ala Ile
 130 135 140

Thr Phe Ser Thr Asp Ser Leu Ser Ala Pro Ala Pro Gln Val Phe Leu
 145 150 155 160

Gln Ala Thr Arg Glu Glu Ser Arg Ile Leu Leu Gln Asp Leu Ser Ser
 165 170 175

Ser Ala Pro His Leu Ala Asn Ala Thr Leu Glu Thr Glu Trp Phe His
 180 185 190

Gly Leu Arg Arg Lys Trp Arg Pro His Leu His Arg Arg Gly Pro Asn
 195 200 205

Gln Gly Pro Arg Gly Leu Gly His Ser Trp Arg Arg Lys Asp Gly Leu
 210 215 220

Gly Gly Asp Lys Ser His Phe Lys Trp Ser Pro Pro Tyr Leu Glu Cys

WO 03/018798

31/91

PCT/EP02/09518

Arg Leu Ala Ile Ile Ser Phe Gln Ala Leu Cys Met Leu Leu Asp Phe
385 390 395 400

Val Ser Met Leu Val Val Tyr His Phe Arg Iys Ala Lys Ser Ile Arg
 405 410 415

Ala Ser Gly Leu Ile Leu Leu Glu Thr Ile Leu Phe Gly Ser Leu Leu
 420 425 430

Leu Tyr Phe Pro Val Val Ile Leu Tyr Phe Glu Pro Ser Thr Phe Arg
 435 440 445

Cys Ile Leu Leu Arg Trp Ala Arg Leu Leu Gly Phe Ala Thr Val Tyr
 450 455 460

Gly Thr Val Thr Leu Lys Leu His Arg Val Leu Lys Val Phe Leu Ser
465 470 475 480

Arg Thr Ala Gln Arg Ile Pro Tyr Met Thr Gly Gly Arg Val Met Arg
 485 490 495

Met Leu Ala Val Ile Leu Leu Val Val Phe Trp Phe Leu Ile Gly Trp
 500 505 510

Thr Ser Ser Val Cys Gln Asn Leu Glu Lys Gln Ile Ser Leu Ile Gly
 515 520 525

WO 03/018798

32/91

PCT/EP02/09518

Gln Gly Lys Thr Ser Asp His Leu Ile Phe Asn Met Cys Leu Ile Asp
530 535 540

Arg Trp Asp Tyr Met Thr Ala Val Ala Glu Phe Leu Phe Leu Leu Trp
545 550 555 560

Gly Val Tyr Leu Cys Tyr Ala Val Arg Thr Val Pro Ser Ala Phe His
565 570 575

Glu Pro Arg Tyr Met Ala Val Ala Val His Asn Glu Leu Ile Ile Ser
580 585 590

Ala Ile Phe His Thr Ile Arg Phe Val Leu Ala Ser Arg Leu Gln Ser
595 600 605

Asp Trp Met Leu Met Leu Tyr Phe Ala His Thr His Leu Thr Val Thr
610 615 620

Val Thr Ile Gly Leu Leu Leu Ile Pro Lys Phe Ser His Ser Ser Asn
625 630 635 640

Asn Pro Arg Asp Asp Ile Ala Thr Glu Ala Tyr Glu Asp Glu Leu Asp
645 650 655

Met Gly Arg Ser Gly Ser Tyr Leu Asn Ser Ser Ile Asn Ser Ala Trp
660 665 670

WO 03/018798

33/91

PCT/EP02/09518

Ser Glu His Ser Leu Asp Pro Glu Asp Ile Arg Asp Glu Leu Lys Lys
675 680 685

Leu Tyr Ala Gln Leu Glu Ile Tyr Lys Arg Lys Lys Met Ile Thr Asn
690 695 700

Asn Pro His Leu Gln Lys Lys Arg Cys Ser Lys Lys Gly Leu Gly Arg
705 710 715 720

Ser Ile Met Arg Arg Ile Thr Glu Ile Pro Glu Thr Val Ser Arg Gln
725 730 735

Cys Pro Lys Glu Asp Lys Glu Gly Ala Asp His Gly Thr Ala Lys Gly
740 745 750

Thr Ala Leu Ile Arg Lys Asn Pro Pro Glu Ser Ser Gly Asn Thr Gly
755 760 765

Lys Ser Lys Glu Glu Thr Leu Lys Asn Arg Val Phe Ser Leu Lys Lys
770 775 780

Ser His Ser Thr Tyr Asp His Val Arg Asp Gln Thr Glu Glu Ser Ser
785 790 795 800

Ser Leu Pro Thr Glu Ser Gln Glu Glu Glu Thr Thr Glu Asn Ser Thr
805 810 815

Leu Glu Ser Leu Ser Gly Lys Lys Leu Thr Gln Lys Leu Lys Glu Asp

WO 03/018798

34/91

PCT/EP02/09518

820

825

830

Ser Glu Ala Glu Ser Thr Glu Ser Val Pro Leu Val Cys Lys Ser Ala
835 840 845

Ser Ala His Asn Leu Ser Ser Glu Lys Lys Thr Gly His Pro Arg Thr
850 855 860

Ser Met Leu Gln Lys Ser Leu Ser Val Ile Ala Ser Ala Lys Glu Lys
865 870 875 880

Thr Leu Gly Leu Ala Gly Lys Thr Gln Thr Ala Gly Val Glu Glu Arg
885 890 895

Thr Lys Ser Gln Lys Pro Leu Pro Lys Asp Lys Glu Thr Asn Arg Asn
900 905 910

His Ser Asn Ser Asp Asn Thr Glu Thr Lys Asp Pro Ala Pro Gln Asn
915 920 925

Ser Asn Pro Ala Glu Glu Pro Arg Lys Pro Gln Lys Ser Gly Ile Met
930 935 940

Lys Gln Gln Arg Val Asn Pro Thr Thr Ala Asn Ser Asp Leu Asn Pro
945 950 955 960

Gly Thr Thr Gln Met Lys Asp Asn Phe Asp Ile Gly Glu Val Cys Pro
965 970 975

WO 03/018798

35/91

PCT/EP02/09518

Trp Glu Val Tyr Asp Leu Thr Pro Gly Pro Val Pro Ser Glu Ser Lys
980 985 990

Val Gln Lys His Val Ser Ile Val Ala Ser Glu Met Glu Lys Asn Pro
995 1000 1005

Thr Phe Ser Leu Lys Glu Lys Ser His His Lys Pro Lys Ala Ala
1010 1015 1020

Glu Val Cys Gln Gln Ser Asn Gln Lys Arg Ile Asp Lys Ala Glu
1025 1030 1035

Val Cys Leu Trp Glu Ser Gln Gly Gln Ser Ile Leu Glu Asp Glu
1040 1045 1050

Lys Leu Leu Ile Ser Lys Thr Pro Val Leu Pro Glu Arg Ala Lys
1055 1060 1065

Glu Glu Asn Gly Gly Gln Pro Arg Ala Ala Asn Val Cys Ala Gly
1070 1075 1080

Gln Ser Glu Glu Leu Pro Pro Lys Ala Val Ala Ser Lys Thr Glu
1085 1090 1095

Asn Glu Asn Leu Asn Gln Ile Gly His Gln Glu Lys Lys Thr Ser
1100 1105 1110

WO 03/018798

36/91

PCT/EP02/09518

Ser Ser Glu Glu Asn Val Arg Gly Ser Tyr Asn Ser Ser Asn Asn
1115 1120 1125

Phe Gln Gln Pro Leu Thr Ser Arg Ala Glu Val Cys Pro Trp Glu
1130 1135 1140

Phe Glu Thr Pro Ala Gln Pro Asn Ala Gly Arg Ser Val Ala Leu
1145 1150 1155

Pro Ala Ser Ser Ala Leu Ser Ala Asn Lys Ile Ala Gly Pro Arg
1160 1165 1170

Lys Glu Glu Ile Trp Asp Ser Phe Lys Val
1175 1180

<210> 5

<211> 8373

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (78)..(7178)

WO 03/018798

37/91

PCT/EP02/09518

<223> human m3RR2

<400> 5
ccagtgct gaaagcacc gctctgct gggctcct ggcctggac cccaggtcc 60

tgagagctgc cccaagg atg ggc acc agg gga gcg gtc atg ccc cct cct 110
Met Gly Thr Arg Gly Ala Val Met Pro Pro Pro
1 5 10

atg tgg ggg ctg ctg ggc tgc tgt ttt gtc tgt gcc tgg gct ctg ggg 158
Met Trp Gly Leu Leu Gly Cys Cys Phe Val Cys Ala Trp Ala Leu Gly
15 20 25

ggt cca cgg ccc atc cgc tct ctg ccc cct ctg tct tcc caa gtc aag 206
Gly Pro Arg Pro Ile Arg Ser Leu Pro Pro Leu Ser Ser Gln Val Lys
30 35 40

cca gga tct gta ccc atg cag gtg ccc cta gag ggg gcc gag gcc gcc 254
Pro Gly Ser Val Pro Met Gln Val Pro Leu Glu Gly Ala Glu Ala Ala
45 50 55

ctc gct tat ctc tac tct gga gat gcc cag cag cta tca cag gtg aat 302
Leu Ala Tyr Leu Tyr Ser Gly Asp Ala Gln Gln Leu Ser Gln Val Asn
60 65 70 75

tgc agt gag cgc tat gaa gcg cgt ggg gca gga gcc atg cca ggg ctc 350
Cys Ser Glu Arg Tyr Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ala Met Pro Gly Leu
80 85 90

ccc cca agc cta cag ggg gca gcg gcc acc ctt gcc cag gcc gcc aat 398
Pro Pro Ser Leu Gln Gly Ala Ala Gly Thr Leu Ala Gln Ala Ala Asn
95 100 105

ttt ctc aac atg ctg ctg caa gcc aac gac atc cgt gag tcc agt gtg 446
Phe Leu Asn Met Leu Leu Gln Ala Asn Asp Ile Arg Glu Ser Ser Val

WO 03/018798

38/91

PCT/EP02/09518

110	115	120	
gag gag gat gtg gaa tgg tac cag gca ctg gtc cgc agc gtc gcc gag			494
Glu Glu Asp Val Glu Trp Tyr Gln Ala Leu Val Arg Ser Val Ala Glu			
125	130	135	
ggg gac cca aga gtg tac agg gct ttg ctg acc ttt aac cct cca cca			542
Gly Asp Pro Arg Val Tyr Arg Ala Leu Leu Thr Phe Asn Pro Pro Pro			
140	145	150	155
ggg gcc agc cac cta cag ctg gcc ctg cag gcc acc cgg act ggg gag			590
Gly Ala Ser His Leu Gln Leu Ala Leu Gln Ala Thr Arg Thr Gly Glu			
160	165	170	
gaa acc atc ctg cag gac ttg tct ggg aac tgg gtg cag gag gag aac			638
Glu Thr Ile Leu Gln Asp Leu Ser Gly Asn Trp Val Gln Glu Glu Asn			
175	180	185	
cct cct ggg gac ctg gac acc cct gcc ctg aag aag cga gtg ttg acc			686
Pro Pro Gly Asp Leu Asp Thr Pro Ala Leu Lys Lys Arg Val Leu Thr			
190	195	200	
aat gac cta ggg agc ctc ggc agc ccc aag tgg ccg cag gca gat gga			734
Asn Asp Leu Gly Ser Leu Gly Ser Pro Lys Trp Pro Gln Ala Asp Gly			
205	210	215	
tat gtg ggg gac acg cag cag gtg agg ctg tct cct cct ttc ctg gaa			782
Tyr Val Gly Asp Thr Gln Gln Val Arg Leu Ser Pro Pro Phe Leu Glu			
220	225	230	235
tgc cag gag gga cgg ctc cga cct gga tgg ctg atc aca ctc tct gcc			830
Cys Gln Glu Gly Arg Leu Arg Pro Gly Trp Leu Ile Thr Leu Ser Ala			
240	245	250	
acc ttc tat gga ctc aag cca gac ctc agc cca gaa gtc agg ggg cag			878
Thr Phe Tyr Gly Leu Lys Pro Asp Leu Ser Pro Glu Val Arg Gly Gln			
255	260	265	

WO 03/018798

39/91

PCT/EP02/09518

gtg cag atg gac gta gat ctc cag agt gtg gac atc aat cag tgt gca	926
Val Gln Met Asp Val Asp Leu Gln Ser Val Asp Ile Asn Gln Cys Ala	
270 275 280	
agt ggc cca ggc tgg tac tct aac aca cac ctg tgt gat ctc aac agc	974
Ser Gly Pro Gly Trp Tyr Ser Asn Thr His Leu Cys Asp Leu Asn Ser	
285 290 295	
acc cag tgt gtt ccc ctg gag agt cag ggc ttt gtt ctt ggc cgc tac	1022
Thr Gln Cys Val Pro Leu Glu Ser Gln Gly Phe Val Leu Gly Arg Tyr	
300 305 310 315	
ctc tgc cgc tgc cga cct gga ttc tac ggg gca agc ccc tct ggg ggg	1070
Leu Cys Arg Cys Arg Pro Gly Phe Tyr Gly Ala Ser Pro Ser Gly Gly	
320 325 330	
tta gag gag agt gac ttc cag act acc ggg caa ttc ggg ttc cca gaa	1118
Leu Glu Glu Ser Asp Phe Gln Thr Thr Gly Gln Phe Gly Phe Pro Glu	
335 340 345	
ggc aga tct ggg aga ctg ctg cag tgt ctg cca tgt cct gag ggc tgc	1166
Gly Arg Ser Gly Arg Leu Leu Gln Cys Leu Pro Cys Pro Glu Gly Cys	
350 355 360	
acc agc tgc atg gat gcc aca ccg tgc ctg gtg gaa gag gcc gcg gtg	1214
Thr Ser Cys Met Asp Ala Thr Pro Cys Leu Val Glu Glu Ala Ala Val	
365 370 375	
ctg cgg gcc gct gtg ctg gcc tgc cag gcc tgc tgc atg ctg gcc atc	1262
Leu Arg Ala Ala Val Leu Ala Cys Gln Ala Cys Cys Met Leu Ala Ile	
380 385 390 395	
ttc ctg agc atg ctg gtc tcc tac cgc tgc cgc cgg aac aag agg atc	1310
Phe Leu Ser Met Leu Val Ser Tyr Arg Cys Arg Arg Asn Lys Arg Ile	
400 405 410	

WO 03/018798

40/91

PCT/EP02/09518

tgg gca tct gga gtg gtc ctg ctg gaa act gtc ctt ttt gga ttc ctg	1358
Trp Ala Ser Gly Val Val Leu Leu Glu Thr Val Leu Phe Gly Phe Leu	
415 420 425	
ctg ctt tac ttt cct gtc ttc atc cta tac ttc aag ccc agt gta ttc	1406
Leu Leu Tyr Phe Pro Val Phe Ile Leu Tyr Phe Lys Pro Ser Val Phe	
430 435 440	
cgc tgc atc gct ctt cgc tgg gtg egg ctg ctg ggt ttt gcc atc gtc	1454
Arg Cys Ile Ala Leu Arg Trp Val Arg Leu Leu Gly Phe Ala Ile Val	
445 450 455	
tac gcc acc atc ata ctc aag ctt tac aga gtg ctg cag ctg ttt ctg	1502
Tyr Gly Thr Ile Ile Leu Lys Leu Tyr Arg Val Leu Gln Leu Phe Leu	
460 465 470 475	
tct cga acg gcc cag cgg agt gcc ctt ctg agc agc ggg cgg ctg ctg	1550
Ser Arg Thr Ala Gln Arg Ser Ala Leu Leu Ser Ser Gly Arg Leu Leu	
480 485 490	
cgg cgc ctg ggg ctg ctc ctg cta cct gtg ctg gcc ttc ctg gct gtg	1598
Arg Arg Leu Gly Leu Leu Leu Leu Pro Val Leu Gly Phe Leu Ala Val	
495 500 505	
tgg acc gtg gcc gcc ctg gag cga gcc atc cag cac gca cct ctg gtg	1646
Trp Thr Val Gly Ala Leu Glu Arg Gly Ile Gln His Ala Pro Leu Val	
510 515 520	
atc cga gcc cac act ccc agt gcc cgc cat ttc tac ctc tgt cac cac	1694
Ile Arg Gly His Thr Pro Ser Gly Arg His Phe Tyr Leu Cys His His	
525 530 535	
gac cgc tgg gac tac atc atg gtt gtg gct gag ctg ctg ctg ctg tgc	1742
Asp Arg Trp Asp Tyr Ile Met Val Val Ala Glu Leu Leu Leu Leu Cys	
540 545 550 555	
tgg gcc agc ttc ctc tgc tac gcc aca cgg gct gtg ctc tgg gcc ttc	1790

WO 03/018798

41/91

PCT/EP02/09518

Trp Gly Ser Phe Leu Cys Tyr Ala Thr Arg Ala Val Leu Ser Ala Phe	
560	570
cat gag cca cgc tac atg ggc atc gcc ctg cac aat gag cta ctg ctt	1838
His Glu Pro Arg Tyr Met Gly Ile Ala Leu His Asn Glu Leu Leu Leu	
575	585
tcc gct gcc ttc cac aca gcc agg ttt gtg ctg gtt ccc tct ctg cac	1886
Ser Ala Ala Phe His Thr Ala Arg Phe Val Leu Val Pro Ser Leu His	
590	600
cgg gac tgg acc ctc ctc ctc ttc ttc ttc cac acc cac agc aca gtc	1934
Pro Asp Trp Thr Leu Leu Phe Phe Phe His Thr His Ser Thr Val	
605	615
acc acc acg ctg gct ctg atc ttc atc cct aag ttc tgg aag ctg ggg	1982
Thr Thr Thr Leu Ala Leu Ile Phe Ile Pro Lys Phe Trp Lys Leu Gly	
620	635
gct cct ccc cgg gag gag atg gtg gat gag gtg tgt gag gac gag ctg	2030
Ala Pro Pro Arg Glu Glu Met Val Asp Glu Val Cys Glu Asp Glu Leu	
640	650
gac ctg cag cac tca ggc tcc tac ctt ggc agc agc atc gcc tca gcc	2078
Asp Leu Gln His Ser Gly Ser Tyr Leu Gly Ser Ser Ile Ala Ser Ala	
655	665
tgg agt gag cac agc ctg gac cct gga gac att cgg gac gag ctg aag	2126
Trp Ser Glu His Ser Leu Asp Pro Gly Asp Ile Arg Asp Glu Leu Lys	
670	680
aag ctc tat gcc cag cta gag gtc cac aaa acc aag gaa atg gcc gca	2174
Lys Leu Tyr Ala Gln Leu Glu Val His Lys Thr Lys Glu Met Ala Ala	
685	695
aac aac ccc cac ctg ccc aag aag cga ggc agc tca tgc cag gga ctg	2222
Asn Asn Pro His Leu Pro Lys Lys Arg Gly Ser Ser Cys Gln Gly Leu	

WO 03/018798	42/91	PCT/EP02/09518		
700	705	710	715	
ggc cgc tcc ttc atg agg tac ctg gcg gaa ttc ccc gag gcc ctg gcc				2270
Gly Arg Ser Phe Met Arg Tyr Leu Ala Glu Phe Pro Glu Ala Leu Ala				
	720	725	730	
agg cag cac tcc cgg gac tca gga tcc cca gcc cac gcc agc ctg ccc				2318
Arg Gln His Ser Arg Asp Ser Gly Ser Pro Gly His Gly Ser Leu Pro				
	735	740	745	
ggc tcc tcc cgc cgc cgg ctc ctc agc tcc agc ctc cag gaa ccc gag				2366
Gly Ser Ser Arg Arg Arg Leu Leu Ser Ser Ser Leu Gln Glu Pro Glu				
	750	755	760	
ggg aca cca gct ctg cac aag tcc cgc agc acc tat gac cag cgc agg				2414
Gly Thr Pro Ala Leu His Lys Ser Arg Ser Thr Tyr Asp Gln Arg Arg				
	765	770	775	
gag cag gac cgg cct ctt ctt gac tca ctg ctg agg agg aag ctg gcc				2462
Glu Gln Asp Pro Pro Leu Leu Asp Ser Leu Leu Arg Arg Lys Leu Ala				
	780	785	790	795
aag aag gcc tct cga aca gag agc cgg gag tcg gtg gag ggg ccc cct				2510
Lys Lys Ala Ser Arg Thr Glu Ser Arg Glu Ser Val Glu Gly Pro Pro				
	800	805	810	
gcc ctg gcc ttc agg tca gcc agc gcc cac aac ctg acg gtg gga gag				2558
Ala Leu Gly Phe Arg Ser Ala Ser Ala His Asn Leu Thr Val Gly Glu				
	815	820	825	
agg cta ccc aga gcc cgg ccc gcc tct ctg cag aag tcg ctc agt gtg				2606
Arg Leu Pro Arg Ala Arg Pro Ala Ser Leu Gln Lys Ser Leu Ser Val				
	830	835	840	
gcc agc tcc agg gaa aag gcc ttg ctc atg gcc agc cag gcc tac ctg				2654
Ala Ser Ser Arg Glu Lys Ala Leu Leu Met Ala Ser Gln Ala Tyr Leu				
	845	850	855	

WO 03/018798

43/91

PCT/EP02/09518

gag gag acc tac cgg caa gca aag gag cgg gag gag cgg aag aag gcc	2702
Glu Glu Thr Tyr Arg Gln Ala Lys Glu Arg Glu Glu Arg Lys Lys Ala	
860 865 870 875	
aag gca gcc atg gcc agc ctg gtg cgg agg cca tca gcc agg agg ctg	2750
Lys Ala Ala Met Ala Ser Leu Val Arg Arg Pro Ser Ala Arg Arg Leu	
880 885 890	
gag cgg cct cga ggg gcc ccc ctg tca gct cca cct tcc cct gcc aag	2798
Glu Arg Pro Arg Gly Ala Pro Leu Ser Ala Pro Pro Ser Pro Ala Lys	
895 900 905	
agc agc agc gtg gac agc tct cac acc tct ggg agg ctt cat gag gag	2846
Ser Ser Ser Val Asp Ser Ser His Thr Ser Gly Arg Leu His Glu Glu	
910 915 920	
gct agg aga agg ctg cct cat cca ccc atc agg cac cag gtt tct acc	2894
Ala Arg Arg Arg Leu Pro His Pro Pro Ile Arg His Gln Val Ser Thr	
925 930 935	
ccc atc ttg gcc ctg tct ggg ggc ctg gga gag cca agg atg cta tct	2942
Pro Ile Leu Ala Leu Ser Gly Gly Leu Gly Glu Pro Arg Met Leu Ser	
940 945 950 955	
ccc acc tcc acc ttg gct cca gct ctg ctg cca gct cta gct cca acc	2990
Pro Thr Ser Thr Leu Ala Pro Ala Leu Leu Pro Ala Leu Ala Pro Thr	
960 965 970	
cca gcc cct gcc ctg gca cca gtc cca gta tcc cca caa agc ccc aac	3038
Pro Ala Pro Ala Leu Ala Pro Val Pro Val Ser Pro Gln Ser Pro Asn	
975 980 985	
tta ctc acc tac atc tgc ccc tgg gag aac gca gaa ctg cca gcc aag	3086
Leu Leu Thr Tyr Ile Cys Pro Trp Glu Asn Ala Glu Leu Pro Ala Lys	
990 995 1000	

WO 03/018798

44/91

PCT/EP02/09518

caa gaa aat gtg ccc cag gaa ggc ccc tca ggg cca gag cga ggc	3131
Gln Glu Asn Val Pro Gln Glu Gly Pro Ser Gly Pro Glu Arg Gly	
1005 1010 1015	
cac cac tcc cct gcc cca gct cga gcc agg ctc tgg agg gcc ctc	3176
His His Ser Pro Ala Pro Ala Arg Ala Arg Leu Trp Arg Ala Leu	
1020 1025 1030	
tct gtt gca gta gag aaa agc agg gct ggg gag aat gag atg gac	3221
Ser Val Ala Val Glu Lys Ser Arg Ala Gly Glu Asn Glu Met Asp	
1035 1040 1045	
gca gag gat gca cat cac cag agg gaa gct aat gat gtg gac gaa	3266
Ala Glu Asp Ala His His Gln Arg Glu Ala Asn Asp Val Asp Glu	
1050 1055 1060	
gac agg ccc aag atc ttc cct aaa tcc cac agc ctc aag gcc cct	3311
Asp Arg Pro Lys Ile Phe Pro Lys Ser His Ser Leu Lys Ala Pro	
1065 1070 1075	
gtt cag cag ggt tcc atg cgc agc ctg ggg ctg gcg att aaa gct	3356
Val Gln Gln Gly Ser Met Arg Ser Leu Gly Leu Ala Ile Lys Ala	
1080 1085 1090	
ctg acc cgt cct cgg agc acc tac aga gag aag gag agt gtg gag	3401
Leu Thr Arg Pro Arg Ser Thr Tyr Arg Glu Lys Glu Ser Val Glu	
1095 1100 1105	
gag agt ccc gag ggg cag aac agc ggg act gcg gga gag agt atg	3446
Glu Ser Pro Glu Gly Gln Asn Ser Gly Thr Ala Gly Glu Ser Met	
1110 1115 1120	
ggg gca ccc tcc cga tcc ccc agg cta ggc cgg ccc aag gcg gtg	3491
Gly Ala Pro Ser Arg Ser Pro Arg Leu Gly Arg Pro Lys Ala Val	
1125 1130 1135	
agt aag cag gcc gct ctt atc ccc tcc gat gac aag gag tcc ctc	3536

WO 03/018798

45/91

PCT/EP02/09518

Ser Lys	Gln Ala Ala Leu Ile	Pro Ser Asp Asp Lys	Glu Ser Leu	
1140	1145	1150		
cag aac	caa cag aac gct cac	acc agc agg atg ctc	caa gtc tgt	3581
Gln Asn	Gln Gln Asn Ala His	Thr Ser Arg Met Leu	Gln Val Cys	
1155	1160	1165		
caa cgg	gag ggc agc agg gaa	caa gaa gac aga ggc	agg agg atg	3626
Gln Arg	Glu Gly Ser Arg Glu	Gln Glu Asp Arg Gly	Arg Arg Met	
1170	1175	1180		
acc cag	ggt cta ggg gaa cgg	aaa gct gag aga gca	ggt aaa aca	3671
Thr Gln	Gly Leu Gly Glu Arg	Lys Ala Glu Arg Ala	Gly Lys Thr	
1185	1190	1195		
ggg ctt	gcc atg ctg agg caa	gtt tcc agg gac aaa	aac atc aag	3716
Gly Leu	Ala Met Leu Arg Gln	Val Ser Arg Asp Lys	Asn Ile Lys	
1200	1205	1210		
caa tca	aaa gaa acc cct gtc	ggg tgg cag gaa ctg	ccc aaa gct	3761
Gln Ser	Lys Glu Thr Pro Val	Gly Trp Gln Glu Leu	Pro Lys Ala	
1215	1220	1225		
ggc ctc	cag tcc ctc ggc agc	gct gac cac agg gtg	gca gag gta	3806
Gly Leu	Gln Ser Leu Gly Ser	Ala Asp His Arg Val	Ala Glu Val	
1230	1235	1240		
tgc ccc	tgg gag gtc act gaa	tca gaa acg cgt cag	cca gac agt	3851
Cys Pro	Trp Glu Val Thr Glu	Ser Glu Thr Arg Gln	Pro Asp Ser	
1245	1250	1255		
ggc aac	aag gcc gaa atc tgc	ccc tgg gag acg agt	gaa gga gcc	3896
Gly Asn	Lys Ala Glu Ile Cys	Pro Trp Glu Thr Ser	Glu Gly Ala	
1260	1265	1270		
cca gag	tcg agg gca cta aga	caa gac cca ggt gac	tcc caa aaa	3941
Pro Glu	Ser Arg Ala Leu Arg	Gln Asp Pro Gly Asp	Ser Gln Lys	

WO 03/018798

46/91

PCT/EP02/09518

1275	1280	1285	
aag aga ggg gag gcc cgg gga	aaa tca gag ccc ata	gat gtg gtt	3986
Lys Arg Gly Glu Ala Arg Gly	Lys Ser Glu Pro Ile	Asp Val Val	
1290	1295	1300	
ccc atg atg cgg aaa aag cca	gag agg ctg gtg agg	gag cag gaa	4031
Pro Met Met Arg Lys Lys Pro	Glu Arg Leu Val Arg	Glu Gln Glu	
1305	1310	1315	
gca gtg tgt ccc tgg gag agt	gcc gat cga gga ggt	ctg tcc cct	4076
Ala Val Cys Pro Trp Glu Ser	Ala Asp Arg Gly Gly	Leu Ser Pro	
1320	1325	1330	
ggg tca gct cct cag gac cct	ggc aga atc aga gac	aaa tct gag	4121
Gly Ser Ala Pro Gln Asp Pro	Gly Arg Ile Arg Asp	Lys Ser Glu	
1335	1340	1345	
gcg ggg gac agt gtg gag gcc	agg aag gtg gag aag	cct ggg tgg	4166
Ala Gly Asp Ser Val Glu Ala	Arg Lys Val Glu Lys	Pro Gly Trp	
1350	1355	1360	
gaa gct gct gcc cca gaa gct	cat acc cct gac atc	acc aag gca	4211
Glu Ala Ala Gly Pro Glu Ala	His Thr Pro Asp Ile	Thr Lys Ala	
1365	1370	1375	
gag ccg tgt ccc tgg gag gca	agt gaa gga ggc gag	gat ggg aaa	4256
Glu Pro Cys Pro Trp Glu Ala	Ser Glu Gly Gly Glu	Asp Gly Lys	
1380	1385	1390	
cca gcc caa gag gca gtg aag	gat ctc cct cag gaa	aag cag aaa	4301
Pro Ala Gln Glu Ala Val Lys	Asp Leu Pro Gln Glu	Lys Gln Lys	
1395	1400	1405	
acc agg aaa gca acc ttt tgg	aaa gaa cag aaa ccg	gga gga gac	4346
Thr Arg Lys Ala Thr Phe Trp	Lys Glu Gln Lys Pro	Gly Gly Asp	
1410	1415	1420	

WO 03/018798

47/91

PCT/EP02/09518

ttg gag tct ctt tgt cca tgg gag agt aca gat ttc cgg ggc ccc	4391
Leu Glu Ser Leu Cys Pro Trp Glu Ser Thr Asp Phe Arg Gly Pro	
1425 1430 1435	
tca gca gtc tca att cag gcc cca gga agc tca gag tgt tca ggg	4436
Ser Ala Val Ser Ile Gln Ala Pro Gly Ser Ser Glu Cys Ser Gly	
1440 1445 1450	
agt ttg ggc agt ggc att gct gaa gtg tgt ctg tgg gag gca gga	4481
Ser Leu Gly Ser Gly Ile Ala Glu Val Cys Leu Trp Glu Ala Gly	
1455 1460 1465	
gat gct cct gct atc cag aaa gca gag atc tgt ccc tgg gag ctg	4526
Asp Ala Pro Ala Ile Gln Lys Ala Glu Ile Cys Pro Trp Glu Leu	
1470 1475 1480	
gat gat aac gtg atg ggg cag gaa atg ctg agt ctg ggg aca ggt	4571
Asp Asp Asn Val Met Gly Gln Glu Met Leu Ser Leu Gly Thr Gly	
1485 1490 1495	
aga gaa tct ctt caa gaa aag gaa aaa gcc tcc aga aaa gga agc	4616
Arg Glu Ser Leu Gln Glu Lys Glu Lys Ala Ser Arg Lys Gly Ser	
1500 1505 1510	
ttt gga gag atg ggy gaa caa act gtg aaa gca gtg cag aaa tta	4661
Phe Gly Glu Met Gly Glu Gln Thr Val Lys Ala Val Gln Lys Leu	
1515 1520 1525	
agt caa cag cag gag tca gtt tgt ccc agy gag agc acg gtc cct	4706
Ser Gln Gln Gln Glu Ser Val Cys Pro Arg Glu Ser Thr Val Pro	
1530 1535 1540	
ggg cac tcc agc cca tgt cta gac aat tcc tca tcc aaa gct ggt	4751
Gly His Ser Ser Pro Cys Leu Asp Asn Ser Ser Ser Lys Ala Gly	
1545 1550 1555	

WO 03/018798

48/91

PCT/EP02/09518

agc caa ttc cta tgc aat gga gga agc aga gca acg cag gtg tgt	4796
Ser Gln Phe Leu Cys Asn Gly Gly Ser Arg Ala Thr Gln Val Cys	
1560 1565 1570	
cca cag gaa gat ctc agy ccg gag gca cag gaa gca aca cct gcc	4841
Pro Gln Glu Asp Leu Arg Pro Glu Ala Gln Glu Ala Thr Pro Ala	
1575 1580 1585	
aaa aca gaa atc tgt ccc tgg gag gta aat gaa aga aca aga gag	4886
Lys Thr Glu Ile Cys Pro Trp Glu Val Asn Glu Arg Thr Arg Glu	
1590 1595 1600	
gaa tgg aca tca gca cag gtg cca aga gga gga gaa tct caa aag	4931
Glu Trp Thr Ser Ala Gln Val Pro Arg Gly Gly Glu Ser Gln Lys	
1605 1610 1615	
gac aag gag aaa atg cct gga aaa tcg gaa atc gaa gat gtc aca	4976
Asp Lys Glu Lys Met Pro Gly Lys Ser Glu Ile Glu Asp Val Thr	
1620 1625 1630	
gct tgg gaa aag cct gag ggg cag atc caa aag caa gaa gcg gtc	5021
Ala Trp Glu Lys Pro Glu Gly Gln Ile Gln Lys Gln Glu Ala Val	
1635 1640 1645	
ggc ccc tgg gag agt gtg gac cct ggc agc ttc tcc cca caa cca	5066
Gly Pro Trp Glu Ser Val Asp Pro Gly Ser Phe Ser Pro Gln Pro	
1650 1655 1660	
cgt cct caa gac aca gag aga ccc caa acc ctt ctc cag atg tca	5111
Arg Pro Gln Asp Thr Glu Arg Pro Gln Thr Leu Leu Gln Met Ser	
1665 1670 1675	
ggc agt gtg gga agc aaa gct gcc gac att tgc cct ttg gat gtg	5156
Gly Ser Val Gly Ser Lys Ala Ala Asp Ile Cys Pro Leu Asp Val	
1680 1685 1690	
gag gaa aac ttg act gct ggg aag gca gaa atc tgt ccc tgg gag	5201

WO 03/018798

49/91

PCT/EP02/09518

Glu Glu Asn Leu Thr Ala Gly	Lys Ala Glu Ile Cys	Pro Trp Glu	
1695	1700	1705	
gtg ggt gct gga gca ggg gag	gaa agg gct ttg gga	gct gag gcc	5246
Val Gly Ala Gly Ala Gly Glu	Glu Arg Ala Leu Gly	Ala Glu Ala	
1710	1715	1720	
att agg aaa tct cca aat gat	aca ggc aag gtt tct	gca gat ctt	5291
Ile Arg Lys Ser Pro Asn Asp	Thr Gly Lys Val Ser	Ala Asp Leu	
1725	1730	1735	
gga ccc agg gag aga gct gtt	act gct cca gag aag	cca cag aag	5336
Gly Pro Arg Glu Arg Ala Val	Thr Ala Pro Glu Lys	Pro Gln Lys	
1740	1745	1750	
cca acc cca gag tgg gag gtg	gct tgt ccc tgg ggg	agt gtg ggt	5381
Pro Thr Pro Glu Trp Glu Val	Ala Cys Pro Trp Gly	Ser Val Gly	
1755	1760	1765	
cca ggg gcc tgt tct cag cat	cca ggt act cta gat	gct gat gga	5426
Pro Gly Ala Cys Ser Gln His	Pro Gly Thr Leu Asp	Ala Asp Gly	
1770	1775	1780	
cca aaa gct ggg ttc cag gaa	ctg gat cat atg ggc	tgc agg cca	5471
Pro Lys Ala Gly Phe Gln Glu	Leu Asp His Met Gly	Cys Arg Pro	
1785	1790	1795	
ggt gaa gtg tgt ccc tgg gaa	gca cag gaa gct gct	acc agt gaa	5516
Gly Glu Val Cys Pro Trp Glu	Ala Gln Glu Ala Ala	Thr Ser Glu	
1800	1805	1810	
aaa gcc aag atc tgt ccc tgg	gag gta agt gaa gga	act act ggg	5561
Lys Ala Lys Ile Cys Pro Trp	Glu Val Ser Glu Gly	Thr Thr Gly	
1815	1820	1825	
aag gga ttg gac caa aag gca	ggg agt gaa tca gca	gag cag agg	5606
Lys Gly Leu Asp Gln Lys Ala	Gly Ser Glu Ser Ala	Glu Gln Arg	

WO 03/018798	50/91	PCT/EP02/09518
1830	1835	1840
gag aaa gct cta gaa aag ggg aga ctc act tcc ctg gga gaa gac		5651
Glu Lys Ala Leu Glu Lys Gly Arg Leu Thr Ser Leu Gly Glu Asp		
1845	1850	1855
gta tca aaa ggg atg gca aaa ctg tgt caa caa cag gaa act att		5696
Val Ser Lys Gly Met Ala Lys Leu Cys Gln Gln Gln Glu Thr Ile		
1860	1865	1870
tgt att tgg gag aac aag gac ttg agg gaa tcc cct gct cag gcc		5741
Cys Ile Trp Glu Asn Lys Asp Leu Arg Glu Ser Pro Ala Gln Ala		
1875	1880	1885
ccc aag atc tca gac ttg ccc agc agc atg agt agt gaa gtg gca		5786
Pro Lys Ile Ser Asp Leu Pro Ser Ser Met Ser Ser Glu Val Ala		
1890	1895	1900
gag gga cat tcc ttg gaa gca aca gag aag ggg gac ctg aga caa		5831
Glu Gly His Ser Leu Glu Ala Thr Glu Lys Gly Asp Leu Arg Gln		
1905	1910	1915
gac cca aag aca ggt tcc ttc cca gaa cac ata acc caa gaa aaa		5876
Asp Pro Lys Thr Gly Ser Phe Pro Glu His Ile Thr Gln Glu Lys		
1920	1925	1930
gct cca gct gca gac aca gaa gaa ttc act act gaa gat ggg gaa		5921
Ala Pro Ala Ala Asp Thr Glu Glu Phe Thr Thr Glu Asp Gly Glu		
1935	1940	1945
aaa aca agc cat gag cta caa tcc gtc tgt cca tgg gag acc act		5966
Lys Thr Ser His Glu Leu Gln Ser Val Cys Pro Trp Glu Thr Thr		
1950	1955	1960
gcc cca gca gat tcc gtc tct cac cta gac aga cag cgc cct gac		6011
Ala Pro Ala Asp Ser Val Ser His Leu Asp Arg Gln Arg Pro Asp		
1965	1970	1975

WO 03/018798

51/91

PCT/EP02/09518

caa cct	aaa gct agc tcc cag	aga ctg gtc agc act	ggg ggc agg	6056
Gln Pro	Lys Ala Ser Ser Gln	Arg Leu Val Ser Thr	Gly Gly Arg	
1980	1985	1990		
gcc gct	gac gtg tgc cca tgg	gat gtt cct gat gca	ggg gtg tat	6101
Ala Ala	Asp Val Cys Pro Trp	Asp Val Pro Asp Ala	Gly Val Tyr	
1995	2000	2005		
aaa tct	gac agc agt gcc aag	gct gag acc tgt ccc	tgg gaa gtg	6146
Lys Ser	Asp Ser Ser Ala Lys	Ala Glu Thr Cys Pro	Trp Glu Val	
2010	2015	2020		
act gaa	aga atc cct gtc aaa	ggg gtg tca agg cag	gat gga aaa	6191
Thr Glu	Arg Ile Pro Val Lys	Gly Val Ser Arg Gln	Asp Gly Lys	
2025	2030	2035		
ggg gac	tct caa gaa gag aaa	ggc aga gcc cca gaa	aaa tca gag	6236
Gly Asp	Ser Gln Glu Glu Lys	Gly Arg Ala Pro Glu	Lys Ser Glu	
2040	2045	2050		
cca aaa	ggg gtg cca gtt cag	aaa aag cca gag atg	gca gac ttc	6281
Pro Lys	Gly Val Pro Val Gln	Lys Lys Pro Glu Met	Ala Asp Phe	
2055	2060	2065		
agg cag	cag gag gct gtg tgt	ccc tgg gag agt caa	gat ggc aag	6326
Arg Gln	Gln Glu Ala Val Cys	Pro Trp Glu Ser Gln	Asp Gly Lys	
2070	2075	2080		
ggg ctg	tcc cca cag cca gcc	cca gat gct tct gac	aga agc aga	6371
Gly Leu	Ser Pro Gln Pro Ala	Pro Asp Ala Ser Asp	Arg Ser Arg	
2085	2090	2095		
ggc agt	tct gag gca gca ggc	agt gtg gag acc agg	gta gcg gaa	6416
Gly Ser	Ser Glu Ala Ala Gly	Ser Val Glu Thr Arg	Val Ala Glu	
2100	2105	2110		

WO 03/018798

52/91

PCT/EP02/09518

gtg tgt	ctg tgg gaa gtg gta	gag gct ccc tct gcc	aag aaa gca	6461
Val Cys	Leu Trp Glu Val Val	Glu Ala Pro Ser Ala	Lys Lys Ala	
2115	2120	2125		
gag atc	tgc cct tgg gag gcg	ggc gga gga gca gca	gag gaa ggg	6506
Glu Ile	Cys Pro Trp Glu Ala	Gly Gly Gly Ala Ala	Glu Glu Gly	
2130	2135	2140		
gaa cag	gaa aga gaa tca caa	ggg caa gga gag atg	ttc ctt cag	6551
Glu Gln	Glu Arg Glu Ser Gln	Gly Gln Gly Glu Met	Phe Leu Gln	
2145	2150	2155		
aag gca	gga cct gga ggg acg	gaa gaa cac ttc tca	aaa gca gca	6596
Lys Ala	Gly Pro Gly Gly Thr	Glu Glu His Phe Ser	Lys Ala Ala	
2160	2165	2170		
gca aag	ccc aga gag cag gag	gca gtc tgc cct ggg	gaa ggc aca	6641
Ala Lys	Pro Arg Glu Gln Glu	Ala Val Cys Pro Gly	Glu Gly Thr	
2175	2180	2185		
ggc tca	gga ggg ctc ttg ccc	cag tca ggt gcc ctg	gac cca gaa	6686
Gly Ser	Gly Gly Leu Leu Pro	Gln Ser Gly Ala Leu	Asp Pro Glu	
2190	2195	2200		
ctc aaa	gtc agc ccc aag gaa	gca ggc agc atg gga	agc agg atg	6731
Leu Lys	Val Ser Pro Lys Glu	Ala Gly Ser Met Gly	Ser Arg Met	
2205	2210	2215		
gca gag	ctg tgc caa tgg gaa	atc aca gat cca gaa	gga aat aaa	6776
Ala Glu	Leu Cys Gln Trp Glu	Ile Thr Asp Pro Glu	Gly Asn Lys	
2220	2225	2230		
ata aag	ggc acc atg gca gac	atc tgt cct ggg gag	gaa act gga	6821
Ile Lys	Gly Thr Met Ala Asp	Ile Cys Pro Gly Glu	Glu Thr Gly	
2235	2240	2245		
gtc cca	tct gag gaa tct ggc	ctc ctg gct tta aca	gca act cgg	6866

WO 03/018798

53/91

PCT/EP02/09518

Val Pro Ser Glu Glu Ser Gly Leu Leu Ala Leu Thr Ala Thr Arg	
2250	2255 2260
aga gaa ttt ttc ccc aca gct cct gaa aaa cca cta tgc ctt tta	6911
Arg Glu Phe Phe Pro Thr Ala Pro Glu Lys Pro Leu Cys Leu Leu	
2265	2270 2275
gtc cat ggg cct ctg gat cac ttc ttt cca gaa agc aaa atc ccc	6956
Val His Gly Pro Leu Asp His Phe Phe Pro Glu Ser Lys Ile Pro	
2280	2285 2290
tgc ccc aag gta agc agg cca gcc agt act ttc act cta gaa ggt	7001
Cys Pro Lys Val Ser Arg Pro Ala Ser Thr Phe Thr Leu Glu Gly	
2295	2300 2305
gtc aga gaa cta caa gga cct tca ggg ctt gag cca agg acc agc	7046
Val Arg Glu Leu Gln Gly Pro Ser Gly Leu Glu Pro Arg Thr Ser	
2310	2315 2320
tta gcc cca gag cca agt ctc cag gaa gct gag tct cag tct tcg	7091
Leu Ala Pro Glu Pro Ser Leu Gln Glu Ala Glu Ser Gln Ser Ser	
2325	2330 2335
tcc tta act gaa gac tca ggc caa gtg gct ttt gaa gct cag tat	7136
Ser Leu Thr Glu Asp Ser Gly Gln Val Ala Phe Glu Ala Gln Tyr	
2340	2345 2350
gaa gaa ttc acc cct ccc act gtc tat cct tgg gat tgg gag	7178
Glu Glu Phe Thr Pro Pro Thr Val Tyr Pro Trp Asp Trp Glu	
2355	2360 2365
taacagcctt attaggtgag gtcaaacaca gagctagctt tcaggagcca aggcctttc	7238
caagtcagg tgtcccaaa gagctgaatc aaagacagct tggcoacttc ccctccttga	7298
gaagaccaga agtcaacca tcccaagac aaactgcatg aaaaggtac agcttagacc	7358

WO 03/018798

54/91

PCT/EP02/09518

ccaatgggaa ggcccaccct ctctttactt ctaacttttc ttctgtttg aggaacaaaa 7418
gactggacac tctacttota aggaagcctc ccatccaact acagtactca caacacaaac 7478
caccggagtc tggacactca cccacaaagc cactgttagg gatgaaaaaa gtoagttgtg 7538
cccagcctac cttctctcac agggggacc cttctctga agtctacgat ggagcatttt 7598
ttgagaagaa actaaacat acaagtgtt ggcaacgtag ggatggtgga ccacagaagg 7658
ctataaaggc caccatagaa agctgaagag ccaatttaatt gaagcggaag ataaattggg 7718
ggaaaagcta aaatgactca aaataggggc ctgaaaatgc ttaaggacc ttgtcatttt 7778
gactttgaat ctctgttttc tctttattg cttctctac ctgacctgct tgactgctga 7838
agcagaacaa atcaggcacy ctgacacctc tctcagcctc tggcatccaa agcaacatca 7898
gagagagaga acacagaaga aaagcaattg cccaggctcc tcccacagt caagggagct 7958
cttctctcca gacatccttg tctgctctt gctagttttt taggggtct cccctcttc 8018
ctgacctagc tctcaccagt ctccagagct cgtctcactg gctcatttc ttcccctag 8078
cttttcagcg ctgcatcaa caggacctct ctctttgtc aaggcaactg gactcaaggg 8138
gaatctctgg ttctgatgca agaccatcc accctcccc accctcccc gcccaagaat 8198
caettgctca gtaacaagag gccacatcaa tctcttcca gaggagctca agaaaggcag 8258
tctgtacac agccagcact ctacttcttc tgcctctaa aagaggagt ctacagggca 8318
agttagcttt ccagcacagt ggccggcctc cagctctaga gggcccttt aaacc 8373

<210> 6

WO 03/018798

55/91

PCT/EP02/09518

<211> 2367

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Gly Thr Arg Gly Ala Val Met Pro Pro Pro Met Trp Gly Leu Leu
1 5 10 15

Gly Cys Cys Phe Val Cys Ala Trp Ala Leu Gly Gly Pro Arg Pro Ile
 20 25 30

Arg Ser Leu Pro Pro Leu Ser Ser Gln Val Lys Pro Gly Ser Val Pro
 35 40 45

Met Gln Val Pro Leu Glu Gly Ala Glu Ala Ala Leu Ala Tyr Leu Tyr
 50 55 60

Ser Gly Asp Ala Gln Gln Leu Ser Gln Val Asn Cys Ser Glu Arg Tyr
65 70 75 80

Glu Ala Arg Gly Ala Gly Ala Met Pro Gly Leu Pro Pro Ser Leu Gln
 85 90 95

Gly Ala Ala Gly Thr Leu Ala Gln Ala Ala Asn Phe Leu Asn Met Leu
 100 105 110

WO 03/018798

56/91

PCT/EP02/09518

Leu Gln Ala Asn Asp Ile Arg Glu Ser Ser Val Glu Glu Asp Val Glu
115 120 125

Trp Tyr Gln Ala Leu Val Arg Ser Val Ala Glu Gly Asp Pro Arg Val
130 135 140

Tyr Arg Ala Leu Leu Thr Phe Asn Pro Pro Pro Gly Ala Ser His Leu
145 150 155 160

Gln Leu Ala Leu Gln Ala Thr Arg Thr Gly Glu Glu Thr Ile Leu Gln
165 170 175

Asp Leu Ser Gly Asn Trp Val Gln Glu Glu Asn Pro Pro Gly Asp Leu
180 185 190

Asp Thr Pro Ala Leu Lys Lys Arg Val Leu Thr Asn Asp Leu Gly Ser
195 200 205

Leu Gly Ser Pro Lys Trp Pro Gln Ala Asp Gly Tyr Val Gly Asp Thr
210 215 220

Gln Gln Val Arg Leu Ser Pro Pro Phe Leu Glu Cys Gln Glu Gly Arg
225 230 235 240

Leu Arg Pro Gly Trp Leu Ile Thr Leu Ser Ala Thr Phe Tyr Gly Leu
245 250 255

WO 03/018798

57/91

PCT/EP02/09518

Lys Pro Asp Leu Ser Pro Glu Val Arg Gly Gln Val Gln Met Asp Val
 260 265 270

Asp Leu Gln Ser Val Asp Ile Asn Gln Cys Ala Ser Gly Pro Gly Trp
 275 280 285

Tyr Ser Asn Thr His Leu Cys Asp Leu Asn Ser Thr Gln Cys Val Pro
 290 295 300

Leu Glu Ser Gln Gly Phe Val Leu Gly Arg Tyr Leu Cys Arg Cys Arg
 305 310 315 320

Pro Gly Phe Tyr Gly Ala Ser Pro Ser Gly Gly Leu Glu Glu Ser Asp
 325 330 335

Phe Gln Thr Thr Gly Gln Phe Gly Phe Pro Glu Gly Arg Ser Gly Arg
 340 345 350

Leu Leu Gln Cys Leu Pro Cys Pro Glu Gly Cys Thr Ser Cys Met Asp
 355 360 365

Ala Thr Pro Cys Leu Val Glu Glu Ala Ala Val Leu Arg Ala Ala Val
 370 375 380

Leu Ala Cys Gln Ala Cys Cys Met Leu Ala Ile Phe Leu Ser Met Leu
 385 390 395 400

Val Ser Tyr Arg Cys Arg Arg Asn Lys Arg Ile Trp Ala Ser Gly Val

WO 03/018798

58/91

PCT/EP02/09518

405

410

415

Val Leu Leu Glu Thr Val Val Leu Phe Gly Phe Leu Leu Leu Tyr Phe Pro
420 425 430

Val Phe Ile Leu Tyr Phe Lys Pro Ser Val Phe Arg Cys Ile Ala Leu
435 440 445

Arg Trp Val Arg Leu Leu Gly Phe Ala Ile Val Tyr Gly Thr Ile Ile
450 455 460

Leu Lys Leu Tyr Arg Val Leu Gln Leu Phe Leu Ser Arg Thr Ala Gln
465 470 475 480

Arg Ser Ala Leu Leu Ser Ser Gly Arg Leu Leu Arg Arg Leu Gly Leu
485 490 495

Leu Leu Leu Pro Val Leu Gly Phe Leu Ala Val Trp Thr Val Gly Ala
500 505 510

Leu Glu Arg Gly Ile Gln His Ala Pro Leu Val Ile Arg Gly His Thr
515 520 525

Pro Ser Gly Arg His Phe Tyr Leu Cys His His Asp Arg Trp Asp Tyr
530 535 540

Ile Met Val Val Ala Glu Leu Leu Leu Leu Cys Trp Gly Ser Phe Leu
545 550 555 560

WO 03/018798

59/91

PCT/EP02/09518

Cys Tyr Ala Thr Arg Ala Val Leu Ser Ala Phe His Glu Pro Arg Tyr
565 570 575

Met Gly Ile Ala Leu His Asn Glu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Phe His
580 585 590

Thr Ala Arg Phe Val Leu Val Pro Ser Leu His Pro Asp Trp Thr Leu
595 600 605

Leu Leu Phe Phe Phe His Thr His Ser Thr Val Thr Thr Thr Leu Ala
610 615 620

Leu Ile Phe Ile Pro Lys Phe Trp Lys Leu Gly Ala Pro Pro Arg Glu
625 630 635 640

Glu Met Val Asp Glu Val Cys Glu Asp Glu Leu Asp Leu Gln His Ser
645 650 655

Gly Ser Tyr Leu Gly Ser Ser Ile Ala Ser Ala Trp Ser Glu His Ser
660 665 670

Leu Asp Pro Gly Asp Ile Arg Asp Glu Leu Lys Lys Leu Tyr Ala Gln
675 680 685

Leu Glu Val His Lys Thr Lys Glu Met Ala Ala Asn Asn Pro His Leu
690 695 700

WO 03/018798

60/91

PCT/EP02/09518

Pro Lys Lys Arg Gly Ser Ser Cys Gln Gly Leu Gly Arg Ser Phe Met
705 710 715 720

Arg Tyr Leu Ala Glu Phe Pro Glu Ala Leu Ala Arg Gln His Ser Arg
 725 730 735

Asp Ser Gly Ser Pro Gly His Gly Ser Leu Pro Gly Ser Ser Arg Arg
 740 745 750

Arg Leu Leu Ser Ser Ser Leu Gln Glu Pro Glu Gly Thr Pro Ala Leu
 755 760 765

His Lys Ser Arg Ser Thr Tyr Asp Gln Arg Arg Glu Gln Asp Pro Pro
 770 775 780

Leu Leu Asp Ser Leu Leu Arg Arg Lys Leu Ala Lys Lys Ala Ser Arg
785 790 795 800

Thr Glu Ser Arg Glu Ser Val Glu Gly Pro Pro Ala Leu Gly Phe Arg
 805 810 815

Ser Ala Ser Ala His Asn Leu Thr Val Gly Glu Arg Leu Pro Arg Ala
 820 825 830

Arg Pro Ala Ser Leu Gln Lys Ser Leu Ser Val Ala Ser Ser Arg Glu
 835 840 845

WO 03/018798

61/91

PCT/EP02/09518

Lys Ala Leu Leu Met Ala Ser Gln Ala Tyr Leu Glu Glu Thr Tyr Arg
850 855 860

Gln Ala Lys Glu Arg Glu Glu Arg Lys Lys Ala Lys Ala Ala Met Ala
865 870 875 880

Ser Leu Val Arg Arg Pro Ser Ala Arg Arg Leu Glu Arg Pro Arg Gly
885 890 895

Ala Pro Leu Ser Ala Pro Pro Ser Pro Ala Lys Ser Ser Ser Val Asp
900 905 910

Ser Ser His Thr Ser Gly Arg Leu His Glu Glu Ala Arg Arg Arg Leu
915 920 925

Pro His Pro Pro Ile Arg His Gln Val Ser Thr Pro Ile Leu Ala Leu
930 935 940

Ser Gly Gly Leu Gly Glu Pro Arg Met Leu Ser Pro Thr Ser Thr Leu
945 950 955 960

Ala Pro Ala Leu Leu Pro Ala Leu Ala Pro Thr Pro Ala Pro Ala Leu
965 970 975

Ala Pro Val Pro Val Ser Pro Gln Ser Pro Asn Leu Leu Thr Tyr Ile
980 985 990

Cys Pro Trp Glu Asn Ala Glu Leu Pro Ala Lys Gln Glu Asn Val Pro

WO 03/018798

62/91

PCT/EP02/09518

995 1000 1005

 Gln Glu Gly Pro Ser Gly Pro Glu Arg Gly His His Ser Pro Ala
 1010 1015 1020

 Pro Ala Arg Ala Arg Leu Trp Arg Ala Leu Ser Val Ala Val Glu
 1025 1030 1035

 Lys Ser Arg Ala Gly Glu Asn Glu Met Asp Ala Glu Asp Ala His
 1040 1045 1050

 His Gln Arg Glu Ala Asn Asp Val Asp Glu Asp Arg Pro Lys Ile
 1055 1060 1065

 Phe Pro Lys Ser His Ser Leu Lys Ala Pro Val Gln Gln Gly Ser
 1070 1075 1080

 Met Arg Ser Leu Gly Leu Ala Ile Lys Ala Leu Thr Arg Pro Arg
 1085 1090 1095

 Ser Thr Tyr Arg Glu Lys Glu Ser Val Glu Glu Ser Pro Glu Gly
 1100 1105 1110

 Gln Asn Ser Gly Thr Ala Gly Glu Ser Met Gly Ala Pro Ser Arg
 1115 1120 1125

 Ser Pro Arg Leu Gly Arg Pro Lys Ala Val Ser Lys Gln Ala Ala
 1130 1135 1140

WO 03/018798

63/91

PCT/EP02/09518

Leu Ile Pro Ser Asp Asp Lys Glu Ser Leu Gln Asn Gln Gln Asn
1145 1150 1155

Ala His Thr Ser Arg Met Leu Gln Val Cys Gln Arg Glu Gly Ser
1160 1165 1170

Arg Glu Gln Glu Asp Arg Gly Arg Arg Met Thr Gln Gly Leu Gly
1175 1180 1185

Glu Arg Lys Ala Glu Arg Ala Gly Lys Thr Gly Leu Ala Met Leu
1190 1195 1200

Arg Gln Val Ser Arg Asp Lys Asn Ile Lys Gln Ser Lys Glu Thr
1205 1210 1215

Pro Val Gly Trp Gln Glu Leu Pro Lys Ala Gly Leu Gln Ser Leu
1220 1225 1230

Gly Ser Ala Asp His Arg Val Ala Glu Val Cys Pro Trp Glu Val
1235 1240 1245

Thr Glu Ser Glu Thr Arg Gln Pro Asp Ser Gly Asn Lys Ala Glu
1250 1255 1260

Ile Cys Pro Trp Glu Thr Ser Glu Gly Ala Pro Glu Ser Arg Ala
1265 1270 1275

WO 03/018798

64/91

PCT/EP02/09518

Leu Arg Gln Asp Pro Gly Asp Ser Gln Lys Lys Arg Gly Glu Ala
 1280 1285 1290

Arg Gly Lys Ser Glu Pro Ile Asp Val Val Pro Met Met Arg Lys
 1295 1300 1305

Lys Pro Glu Arg Leu Val Arg Glu Gln Glu Ala Val Cys Pro Trp
 1310 1315 1320

Glu Ser Ala Asp Arg Gly Gly Leu Ser Pro Gly Ser Ala Pro Gln
 1325 1330 1335

Asp Pro Gly Arg Ile Arg Asp Lys Ser Glu Ala Gly Asp Ser Val
 1340 1345 1350

Glu Ala Arg Lys Val Glu Lys Pro Gly Trp Glu Ala Ala Gly Pro
 1355 1360 1365

Glu Ala His Thr Pro Asp Ile Thr Lys Ala Glu Pro Cys Pro Trp
 1370 1375 1380

Glu Ala Ser Glu Gly Gly Glu Asp Gly Lys Pro Ala Gln Glu Ala
 1385 1390 1395

Val Lys Asp Leu Pro Gln Glu Lys Gln Lys Thr Arg Lys Ala Thr
 1400 1405 1410

WO 03/018798

65/91

PCT/EP02/09518

Phe Trp Lys Glu Gln Lys Pro Gly Gly Asp Leu Glu Ser Leu Cys
1415 1420 1425

Pro Trp Glu Ser Thr Asp Phe Arg Gly Pro Ser Ala Val Ser Ile
1430 1435 1440

Gln Ala Pro Gly Ser Ser Glu Cys Ser Gly Ser Leu Gly Ser Gly
1445 1450 1455

Ile Ala Glu Val Cys Leu Trp Glu Ala Gly Asp Ala Pro Ala Ile
1460 1465 1470

Gln Lys Ala Glu Ile Cys Pro Trp Glu Leu Asp Asp Asn Val Met
1475 1480 1485

Gly Gln Glu Met Leu Ser Leu Gly Thr Gly Arg Glu Ser Leu Gln
1490 1495 1500

Glu Lys Glu Lys Ala Ser Arg Lys Gly Ser Phe Gly Glu Met Gly
1505 1510 1515

Glu Gln Thr Val Lys Ala Val Gln Lys Leu Ser Gln Gln Gln Glu
1520 1525 1530

Ser Val Cys Pro Arg Glu Ser Thr Val Pro Gly His Ser Ser Pro
1535 1540 1545

Cys Leu Asp Asn Ser Ser Ser Lys Ala Gly Ser Gln Phe Leu Cys

WO 03/018798

66/91

PCT/EP02/09518

1550

1555

1560

Asn Gly Gly Ser Arg Ala Thr Gln Val Cys Pro Gln Glu Asp Leu
 1565 1570 1575

Arg Pro Glu Ala Gln Glu Ala Thr Pro Ala Lys Thr Glu Ile Cys
 1580 1585 1590

Pro Trp Glu Val Asn Glu Arg Thr Arg Glu Glu Trp Thr Ser Ala
 1595 1600 1605

Gln Val Pro Arg Gly Gly Glu Ser Gln Lys Asp Lys Glu Lys Met
 1610 1615 1620

Pro Gly Lys Ser Glu Ile Glu Asp Val Thr Ala Trp Glu Lys Pro
 1625 1630 1635

Glu Gly Gln Ile Gln Lys Gln Glu Ala Val Gly Pro Trp Glu Ser
 1640 1645 1650

Val Asp Pro Gly Ser Phe Ser Pro Gln Pro Arg Pro Gln Asp Thr
 1655 1660 1665

Glu Arg Pro Gln Thr Leu Leu Gln Met Ser Gly Ser Val Gly Ser
 1670 1675 1680

Lys Ala Ala Asp Ile Cys Pro Leu Asp Val Glu Glu Asn Leu Thr
 1685 1690 1695

WO 03/018798

67/91

PCT/EP02/09518

Ala Gly Lys Ala Glu Ile Cys Pro Trp Glu Val Gly Ala Gly Ala
1700 1705 1710

Gly Glu Glu Arg Ala Leu Gly Ala Glu Ala Ile Arg Lys Ser Pro
1715 1720 1725

Asn Asp Thr Gly Lys Val Ser Ala Asp Leu Gly Pro Arg Glu Arg
1730 1735 1740

Ala Val Thr Ala Pro Glu Lys Pro Gln Lys Pro Thr Pro Glu Trp
1745 1750 1755

Glu Val Ala Cys Pro Trp Gly Ser Val Gly Pro Gly Ala Cys Ser
1760 1765 1770

Gln His Pro Gly Thr Leu Asp Ala Asp Gly Pro Lys Ala Gly Phe
1775 1780 1785

Gln Glu Leu Asp His Met Gly Cys Arg Pro Gly Glu Val Cys Pro
1790 1795 1800

Trp Glu Ala Gln Glu Ala Ala Thr Ser Glu Lys Ala Lys Ile Cys
1805 1810 1815

Pro Trp Glu Val Ser Glu Gly Thr Thr Gly Lys Gly Leu Asp Gln
1820 1825 1830

WO 03/018798

68/91

PCT/EP02/09518

Lys Ala Gly Ser Glu Ser Ala Glu Gln Arg Glu Lys Ala Leu Glu
1835 1840 1845

Lys Gly Arg Leu Thr Ser Leu Gly Glu Asp Val Ser Lys Gly Met
1850 1855 1860

Ala Lys Leu Cys Gln Gln Gln Glu Thr Ile Cys Ile Trp Glu Asn
1865 1870 1875

Lys Asp Leu Arg Glu Ser Pro Ala Gln Ala Pro Lys Ile Ser Asp
1880 1885 1890

Leu Pro Ser Ser Met Ser Ser Glu Val Ala Glu Gly His Ser Leu
1895 1900 1905

Glu Ala Thr Glu Lys Gly Asp Leu Arg Gln Asp Pro Lys Thr Gly
1910 1915 1920

Ser Phe Pro Glu His Ile Thr Gln Glu Lys Ala Pro Ala Ala Asp
1925 1930 1935

Thr Glu Glu Phe Thr Thr Glu Asp Gly Glu Lys Thr Ser His Glu
1940 1945 1950

Leu Gln Ser Val Cys Pro Trp Glu Thr Thr Ala Pro Ala Asp Ser
1955 1960 1965

WO 03/018798

69/91

PCT/EP02/09518

Val Ser His Leu Asp Arg Gln Arg Pro Asp Gln Pro Lys Ala Ser
1970 1975 1980

Ser Gln Arg Leu Val Ser Thr Gly Gly Arg Ala Ala Asp Val Cys
1985 1990 1995

Pro Trp Asp Val Pro Asp Ala Gly Val Tyr Lys Ser Asp Ser Ser
2000 2005 2010

Ala Lys Ala Glu Thr Cys Pro Trp Glu Val Thr Glu Arg Ile Pro
2015 2020 2025

Val Lys Gly Val Ser Arg Gln Asp Gly Lys Gly Asp Ser Gln Glu
2030 2035 2040

Glu Lys Gly Arg Ala Pro Glu Lys Ser Glu Pro Lys Gly Val Pro
2045 2050 2055

Val Gln Lys Lys Pro Glu Met Ala Asp Phe Arg Gln Gln Glu Ala
2060 2065 2070

Val Cys Pro Trp Glu Ser Gln Asp Gly Lys Gly Leu Ser Pro Gln
2075 2080 2085

Pro Ala Pro Asp Ala Ser Asp Arg Ser Arg Gly Ser Ser Glu Ala
2090 2095 2100

Ala Gly Ser Val Glu Thr Arg Val Ala Glu Val Cys Leu Trp Glu

WO 03/018798

71/91

PCT/EP02/09518

Ser Gly Leu Leu Ala Leu Thr Ala Thr Arg Arg Glu Phe Phe Pro
2255 2260 2265

Thr Ala Pro Glu Lys Pro Leu Cys Leu Leu Val His Gly Pro Leu
2270 2275 2280

Asp His Phe Phe Pro Glu Ser Lys Ile Pro Cys Pro Lys Val Ser
2285 2290 2295

Arg Pro Ala Ser Thr Phe Thr Leu Glu Gly Val Arg Glu Leu Gln
2300 2305 2310

Gly Pro Ser Gly Leu Glu Pro Arg Thr Ser Leu Ala Pro Glu Pro
2315 2320 2325

Ser Leu Gln Glu Ala Glu Ser Gln Ser Ser Ser Leu Thr Glu Asp
2330 2335 2340

Ser Gly Gln Val Ala Phe Glu Ala Gln Tyr Glu Glu Phe Thr Pro
2345 2350 2355

Pro Thr Val Tyr Pro Trp Asp Trp Glu
2360 2365

<210> 7

WO 03/018798

72/91

PCT/EP02/09518

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 7

cgcactgca tagcagagat aacacc

27

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

WO 03/018798

73/91

PCT/EP02/09518

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 8

caatgagctc atcatctctcg ctatattcc

29

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 9

gcggggctca tggaatgccg atgggac

27

<210> 10

WO 03/018798

74/91

PCT/EP02/09518

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 10

gtcccatcgg cattccatga gccccgc

27

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

WO 03/018798

75/91

PCT/EP02/09518

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 11

caccatgget taccottac toctetgc

28

<210> 12

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 12

egttgttget ettgcccc ttgtectc

28

<210> 13

WO 03/018798

76/91

PCT/EP02/09518

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 13

gtgggaccag ctgtgctgcc attgatc

27

<210> 14

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

WO 03/018798

77/91

PCT/EP02/09518

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 14

cgttgttgct cttgcccccc tggtcctc

28

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> SIGNAL

<222> (1)..(17)

<223>

<400> 15

Met Ala Tyr Pro Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Gln Leu Gly Leu
1 5 10 15

Gly

WO 03/018798

78/91

PCT/EP02/09518

<210> 16

<211> 816

<212> DNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> Unsure

<222> (1)..(816)

<223> Partial sequence of rat mGRR1a

<400> 16

```
aatggaagtc agttgtacac aaccaatatg tgtgctgggc aatatgaaga actgcccccc 60
aaagccgtag catcaaaagt agagaatgaa aatctcaacc aaatgggaga ccaggagaaa 120
cagacatctt ettctgtgga tatcatccct gctcctgta tctcgagtaa taactccctt 180
caaccotaa cgtcacgagc cgaagtgtgt cctggggagt tccagccctt agaacaacca 240
aatgctgaaa gaatcgtagc ttaccocgcc tctctgctt taagtgaag taagataccc 300
gggccacgga aataggaagt ccaggacact ttcaaatgt accaccctgg gaagaaaagg 360
ggtaatcccg agtttgataa aaatagatct gaaatcaaa cgttaccag gaatctttgt 420
```

WO 03/018798

79/91

PCT/EP02/09518

tagcctaggg aaacatggca catggtgogg taaggtgaag gcaagggctg gagaaggcca 480
gaaaaaggca gtaatgtgtg cctccagcca tgaaaaacca gatcaacact gggggacagc 540
ttagcatttc agcctgttaa agggacattt cctgtctgt cttacaagt gggattgaat 600
ggccccaagc aagattcacc aggagcatg gaagacaggg gcatggatt tatgatggat 660
aaacttagat gcacgtgact gtaattctaa gtatogact gaaaagacct tcatcaccta 720
ttaaaccctg gtagcactgc taactaatg cacccagta ccttttatat acacgattgc 780
tctcattttc ttaaaatctg tgtgtctcag taaatt 816

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<223>

<400> 17

WO 03/018798

80/91

PCT/EP02/09518

aatggaagtc agttgtacac

20

<210> 18

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(40)

<223>

<400> 18

taatacactc actatagga aatgtccctt taacaggctg

40

<210> 19

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial

WO 03/018798

81/91

PCT/EP02/09518

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(41)

<223>

<400> 19

taatacagact cactataggg aaatggaagt cagttgtaca c

41

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(20)

<223>

<400> 20

aatgtccctt taacaggctg

20

WO 03/018798

82/91

PCT/EP02/09518

<210> 21

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 21
tatccatag atgtccaga ttatgct

27

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

WO 03/018798

83/91

PCT/EP02/09518

<221> primer_bind

<222> (1)..(22)

<223>

<400> 22
caagactcca gttctcccag ag

22

<210> 23

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(64)

<223>

<400> 23
tctagatcta gactaagcat aatctggaac atcatatgga tacactttta aactatccca 60
gatc 64

WO 03/018798

84/91

PCT/EP02/09518

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 24

ccogtgctc agaagggcac tccgctgg

28

<210> 25

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

WO 03/018798

85/91

PCT/EP02/09518

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 25

tggaccgtgg ggcocctgga gogaggc

27

<210> 26

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 26

gctgggacta catcatgggtt gtgctg

27

WO 03/018798

86/91

PCT/EP02/09518

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 27

gggcccgttcg agacagaaac agctgcag

28

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

WO 03/018798

87/91

PCT/EP02/09518

<221> primer_bind

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 28

caccgctct gctgggctc tectg

25

<210> 29

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 29

cgctgctcag aagggcactc cgctgg

26

WO 03/018798

88/91

PCT/EP02/09518

<210> 30

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 30

ggattcctgc tgccttactt tctgtc

27

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

WO 03/018798

89/91

PCT/EP02/09518

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 31

ccacagacac acttcagcaa tgcc

24

<210> 32

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 32

ccaggaaggt ggagaagcct gggtaggg

27

WO 03/018798

90/91

PCT/EP02/09518

<210> 33

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<221> primer_bind

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 33

ctaaactgcc ctgtagcact cctc

24

<210> 34

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

WO 03/018798

91/91

PCT/EP02/09518

<221> SIGNAL

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 34

Met Gly Thr Arg Gly Ala Val Met Pro Pro Pro Met Trp Gly Leu Leu
1 5 10 15

Gly Cys Cys Phe Val Cys Ala Trp Ala Leu Gly
 20 25

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
6 March 2003 (06.03.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/018798 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 5/10, 15/12, 15/62, 15/63, C07K 14/705, 16/28, G01N 33/68
- (21) International Application Number: PCT/EP02/09518
- (22) International Filing Date: 26 August 2002 (26.08.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/315,111 27 August 2001 (27.08.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except AT, US): NOVARTIS AG [CH/CH]; Lichtstrasse 35, 4056 Basel (CH).
- (71) Applicant (for AT only): NOVARTIS PHARMA GMBH [AT/AT]; Brunner-Strasse 59, A-1230 Vienna (AT).
- (72) Inventor; and
(75) Inventor/Applicant (for US only): KAUPMANN, Kle-mens [DE/DE]; Binzenerstrasse 7D, 79539 Loerrach (DE).
- (74) Agent: GROS, Florent; Novartis AG, Corporate Intellectual Property, Patent & Trademark Department, CH-4002 Basel (CH).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LI, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR).
- Published:
— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- (88) Date of publication of the international search report: 4 December 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 03/018798 A3

(54) Title: G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR AND DNA SEQUENCES THEREOF

(57) Abstract: This invention relates to newly identified polypeptides and polynucleotides encoding such polypeptides, to their use in diagnosis and in identifying compounds that may be agonists, antagonists that are potentially useful in therapy, and to production of such polypeptides and polynucleotides, belonging to the class of G-protein coupled receptors.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/09518
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/10 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/63 C07K14/705 C07K16/28 G01N33/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, SEQUENCE SEARCH, EMBL		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01 57086 A (LEXICON GENETICS INC) 9 August 2001 (2001-08-09) page 5-7; figures 1-9	1, 3, 5-10 1-10
Y	---	---
X	DATABASE EMBL 'Online! 21 August 2000 (2000-08-21) JACOBS K ET AL.: "AAA44159: Human secreted expressed sequence tag SEQ ID NO:734" Database accession no. AAA44159 XP002252119	1, 3, 5, 6
X	& WO 00 21991 A (GENETICS INST INC.) 20 April 2000 (2000-04-20) SEQ ID NO:734 ---	1, 3, 5, 6
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		**I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *** document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone **** document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *M* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 16 September 2003		Date of mailing of the international search report 21/10/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 5916 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 651 epo nl Fax: (+31-70) 340-5016		Authorized officer Heiduschat, C

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/JP 02/09518

C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Details of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HORISAWA M ET AL: "CHARACTERIZATION OF CDNA CLONES SELECTED BY THE GENEMARK ANALYSIS FROM SIZE-FRACTIONATED CDNA LIBRARIES FROM HUMAN BRAIN" DNA RESEARCH, UNIVERSAL ACADEMY PRESS, JP, 'Online!' vol. 6, 1999, pages 329-336, XP000925082 ISSN: 1340-2838 table 1	1,3,5,6
X	-& DATABASE EMBL 'Online!' 11 November 1999 (1999-11-11) OHARA O. ET AL.: "Homo sapiens mRNA for KIAA1136 protein, partial cds" Database accession no. ACCESSION NR. AB32962 XP002175275 cited in the application	1,3,5,6
X	PROBST W C ET AL: "SEQUENCE ALIGNMENT OF THE G-PROTEIN COUPLED RECEPTOR SUPERFAMILY" DNA AND CELL BIOLOGY, NEW YORK, NY, US, vol. 11, no. 1, 1992, pages 1-20, XP002920805 ISSN: 1044-5498 page 1, right-hand column, paragraph 2; figure 3	1-10
Y	KAUPMANN K ET AL: "GABAB-RECEPTOR SUBTYPES ASSEMBLE INTO FUNCTIONAL HETEROMERIC COMPLEXES" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 396, no. 17, December 1998 (1998-12), pages 683-687, XP000867007 ISSN: 0028-0836 figure 1A	1-10
Y	-& DATABASE EMBL 'Online!' 15 December 1998 (1998-12-15) KAUPMANN K.: "Rattus norvegicus mRNA for GABA-B R2 receptor" Database accession no. AJ011318 XP002253074 cited in the application abstract	1-10

Form PCT/ISA/210 (continuation of sequential sheet) (July 1999)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 02/09518

C/Continuation DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KAUPMANN K ET AL: "EXPRESSION CLONING OF GABAB RECEPTORS UNCOVERS SIMILARITY TO METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 386, no. 6622, 20 March 1997 (1997-03-20), pages 239-246, XP002032306 ISSN: 0028-0836 figure 3A	1-10
Y	-& DATABASE EMBL 'Online! 7 April 1997 (1997-04-07) KAUPMANN K. ET AL.: "Rattus norvegicus mRNA for GABA-BR1b receptor" Database accession no. Y130370 XP002253075 cited in the application	1-10
Y	MAKOFF A ET AL: "Molecular characterization and localization of human metabotropic glutamate receptor type 3." BRAIN RESEARCH. MOLECULAR BRAIN RESEARCH. NETHERLANDS AUG 1996, vol. 40, no. 1, August 1996 (1996-08), pages 55-63, XP002252118 ISSN: 0169-328X figure 1	1-10
Y	-& DATABASE EMBL 'Online! 29 January 1996 (1996-01-29) MAKOFF A.J. ET AL.: "H. sapiens mRNA for metabotropic glutamate receptor type 3" Database accession no. X77748 XP002253076	1-10
A	SCHOEPP D D ET AL: "METABOTROPIC GLUTAMATE RECEPTORS IN BRAIN FUNCTION AND PATHOLOGY" TRENDS IN PHARMACOLOGICAL SCIENCES, ELSEVIER TRENDS JOURNAL, CAMBRIDGE, GB, vol. 14, 1993, pages 13-20, XP000197023 ISSN: 0165-6147 page 13 page 19, last paragraph	1-10

0

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	
International application No. PCT/EP 02/09518	
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3.	<input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1.	<input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.	<input checked="" type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	<input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	<input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02 09518

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-10

Subject-matter based on SEQ ID NO:3 and 4 "mGRR1b"

2. Claims: 1-10

Subject-matter based on SEQ ID NO:5 and 6 "mGRR2"

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/EP 02/09518

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0157086	A	09-08-2001	AU 3665601 A	14-08-2001
			CA 2399633 A1	09-08-2001
			EP 1257579 A2	20-11-2002
			WO 0157086 A2	09-08-2001
			US 2002038013 A1	28-03-2002
WO 0021991	A	20-04-2000	AU 1208200 A	01-05-2000
			WO 0021991 A1	20-04-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1999)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A

(81) 指定国 EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, E
E, ES, FI, GB, GD, GE, GH, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LT, LU, LV, MA, MD, MK, MN, MX, NO, NZ, OM, PH, PL
, PT, RO, RU, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TN, TR, TT, UA, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

F ターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02 FB03
4B024 AA01 AA11 BA63 CA04 DA02 DA05 DA11 EA02 EA03 EA04
FA02 GA11 HA01 HA03 HA11
4B063 QA01 QA18 QQ05 QQ13 QR33 QR59 QS05 QS11 QS36
4B064 AG20 CA01 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y AB01 BA01 CA24 CA44
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 DA50 EA20 EA50 FA72
FA74

专利名称(译)	新型G蛋白偶联受体及其DNA序列		
公开(公告)号	JP2005502344A	公开(公告)日	2005-01-27
申请号	JP2003523647	申请日	2002-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	瑞士商诺华公司		
申请(专利权)人(译)	诺华股份公司		
[标]发明人	クレメンスカウプマン		
发明人	クレメンス・カウプマン		
IPC分类号	G01N33/50 A61K38/00 C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	C07K14/705 A61K38/00 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ13 4B063/QR33 4B063/QR59 4B063/QS05 4B063/QS11 4B063/QS36 4B064/AG20 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	小島 一晃		
优先权	60/315111 2001-08-27 US		
其他公开文献	JP2005502344A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及新鉴定的多肽和编码所述多肽的多核苷酸，潜在的诊断和治疗上有用的激动剂，它们在鉴定可能是拮抗剂的化合物和G蛋白缀合物中的用途。本发明涉及产生上述多肽的方法和属于受体类的多核苷酸。

貫膜ドメイン	位置 (配列番号 2)	長さ
I	415-437	23
II	447-469	23
III	483-505	23
IV	523-545	23
V	580-602	23
VI	618-640	23
VII	647-669	23